



Filipa Raquel Fernandes Simões

Licenciada em Química Industrial

DESENVOLVIMENTO DE UM PAPEL DE FILTRO DE BAIXO CUSTO PARA TRATAMENTO DE ÁGUA

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Elvira Maria Correia Fortunato, Professora
Doutora, FCT-UNL

Co-orientador: Rita Maria Mourão Salazar Branquinho,
Doutora, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Alberto Gomes Carlos Salgueiro

Arguente: Mestre Paulo Jorge Nico Casimiro

Vogal: Prof. Doutora Elvira Maria Correia Fortunato



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro de 2014

DESENVOLVIMENTO DE UM PAPEL DE FILTRO DE BAIXO CUSTO PARA TRATAMENTO DE ÁGUA

© Filipa Raquel Fernandes Simões

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Começo por manifestar a minha enorme satisfação por ter terminado uma importante fase da minha vida.

Para mim foi um orgulho realizar a minha dissertação de mestrado no Centro de Investigação de Materiais (CENIMAT/I3N), o que me permitiu lidar diariamente com uma investigação de excelência, sentindo-me uma privilegiada por fazer parte de uma equipa que trabalha diariamente de uma forma árdua e criativa de modo a conseguir marcar a diferença, a nível mundial.

Por isso, e em primeiro lugar, os meus sinceros agradecimentos para a minha orientadora, a Professora Doutora Elvira Fortunato por me permitir realizar este trabalho consigo, pela sua orientação, motivação, esclarecimento de dúvidas, e também liberdade oferecida, o que também estimulou a minha autonomia, em termos profissionais e pessoais.

Agradeço também à minha co-orientadora, a Doutora Rita Branquinho, pela sua transmissão de conhecimentos, ajuda laboratorial, esclarecimento de dúvidas e também amizade demonstrada para comigo.

Dado que para a realização experimental se recorreu à colaboração de algumas entidades, envolvendo portanto a disponibilidade e dedicação de algumas pessoas no projecto, queria expressar o meu profundo agradecimento a todas as pessoas envolvidas, nomeadamente à Professora Doutora Isabel Coutinho e Doutora Sofia Costa, do Instituto de Higiêne e Medicina Tropical, pertencente à Universidade Nova de Lisboa, pela disponibilidade, transmissão de conhecimentos e pela ajuda prestada na realização de testes anti-bacterianos; em particular ao Mestre Paulo Nico pelas suas sugestões, orientação e auxílio; à Técnica Ana Rita Ribeiro, assim como aos técnicos Nuno Carreiras e Cecília Costa, pela sua disponibilidade, simpatia, esclarecimento de dúvidas e ajuda prestada nas filtrações de membrana efectuadas no Laboratório de Águas de Consumo pertencente à SMAS de Almada, e à Professora Dr.^a Ana Luisa, do Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa, da FCT, pela ajuda demonstrada.

Quero agradecer também ao meu Orientador de Estágio do Instituto Português da Qualidade, Vitor Silvino, pela amizade, transmissão de conhecimentos e ainda troca de ideias e sugestões relativas a “problemas” experimentais.

Como não poderia deixar de ser, um grande obrigado a todos os meus amigos e colegas que me acompanharam nesta caminhada, que estiveram sempre do meu lado, transmitindo-me apoio, confiança e perseverança, entre os quais destaco a Tiago Farto, Micaela, Inês, e Carolina.

Por fim, dedico esta tese à minha família, aos meus pais, irmãos e tia, Helena Simões, que são as pessoas mais importantes da minha vida e a quem devo tudo, agradecendo-lhes todo o suporte financeiro, emocional e todo o carinho demonstrado ao longo destes anos.

Em especial ao meu irmão David, que é uma pessoa muito positiva e acredita muito nas minhas capacidades, tendo sempre algo de bom a transmitir.

RESUMO

É sabido que devido à escassez de água potável, nomeadamente em países sub-desenvolvidos, morrem milhares de pessoas por ano, com a procura de fontes de água alternativas, que por sua vez se encontram contaminadas com microrganismos patogénicos; a este facto também se salienta a possibilidade de ocorrência de catástrofes naturais, tornando-se necessário o desenvolvimento de sistemas de desinfecção práticos, de baixo custo e eficientes.

O trabalho experimental desenvolvido focou-se nestas realidades, tendo por objectivo principal o desenvolvimento de um papel bactericida, em particular, um papel de baixo custo como é o caso do papel de filtro de café, para aplicação em desinfecção de água.

Este papel foi funcionalizado com nanopartículas sintetizadas de prata, óxido de zinco e com ambas, assim como com nanopartículas comerciais, cuja caracterização foi feita por Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM, *Scanning Electron Microscopy*), Energia Dispersiva de Raios-X (EDS, *Energy-dispersive X-ray Spectroscopy*), Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-VIS *Uv-Visible Spectroscopy*), Difracção de Raios-X (DRX, *X-Rays Diffraction*), Análise Termogravimétrica (TA, *Thermal Analysis*), e Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) e a actividade anti-bacteriana dos papéis foi avaliada através de Testes de Sensibilidade aos Antibióticos, pelo Método de Kirby-Bauer, contra as bactérias *S.a.ATCC25923* e *E.coli ATCC25922*.

No decorrer das sínteses variaram-se alguns parâmetros consoante o tipo de nanopartícula, para as np's de prata variou-se essencialmente a metodologia de síntese e o tipo de redutor, para as np's de óxido de zinco, dado ser um composto fotossensível, submeteu-se o papel à luz ultravioleta, o que, por outro lado também esterilizava o papel, e para ter uma comparação, esterilizou-se também o papel pela autoclave, constatando-se, pelas técnicas de caracterização, nomeadamente DRX, que os papéis não continham nanopartículas de óxido de zinco mas sim de acetato de zinco. Surpreendentemente, nos papéis autoclavados já se detectou a presença de óxido de zinco.

Com os papéis que evidenciaram maior actividade anti-bacteriana realizaram-se filtrações de membrana com amostras de água contaminada e a determinação da concentração de metal no filtrado foi realizada pela técnica de Espectroscopia de Absorção Atómica de Chama (*Flame Atomic Absorption Spectroscopy*) conseguindo-se uma taxa de redução bacteriana de praticamente 100% para *E.coli NCTC 9001* e *E.f NCTC775* com os papéis contendo acetato de zinco numa concentração de 50 mM e np'sAg e acetato de zinco, numa concentração de 10 mM.

De forma a validar o trabalho desenvolvido a parte final consistiu em testar os filtros com melhores propriedades em águas contaminadas, tendo esse trabalho sido feito no Laboratório de Água de Consumo dos Serviços Municipalizados de Água e Saneamento de Almada.

Palavras-chave: nanopartículas de prata, nanopartículas de óxido de zinco, acetato de zinco, actividade anti-bacteriana, desinfecção de água, papel bactericida, *E.coli NCTC 9001*, *E.f NCTC775*, *S.a.ATCC25923* e *E.coli ATCC25922*

ABSTRACT

It is known that due to scarcity of drinking water, especially in underdeveloped countries, thousands of people die each year, with the demand for alternative sources of water, which in turn are contaminated with pathogenic microorganisms; and in another hand, with the occurrence of natural disasters, it's necessary and urgent and the development of portable water disinfection systems, that could be practise, easy to use, low cost and efficient. This work has focused on these situations, by the development of a bactericide paper, in particular , a low cost paper, like coffee filter for water disinfection.

This paper was functionalized with synthesized silver nanoparticles, zinc oxide nanoparticles, with both of them and commercial nanoparticles, whose characterization was performed by Scanning Electron Microscopy (SEM) Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS), UV-Visible Spectroscopy

X -ray Diffraction (XRD), Thermogravimetric Analysis (TA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC), and the antibacterial activity of the papers was assessed through Sensitivity Tests to Antibiotics by Kirby-Bauer method, against both *S.aureus* ATCC25923 and *E. coli* ATCC25922 bacteria. In the course of the synthesis, some parameters were studied and changed in spite of the type of the nanoparticle, in silver np's synthesis, the methodology of synthesis and the type of reductant were two of the parameters studied, for np's of zinc oxide, as being a photosensitive compound, the papers were put under uv light, which sterilized the paper to, and in order to have a comparison, the papers were sterilized by autoclave.

Through characterization techniques, including XRD, it was detected that the paper samples where was performed the synthesis of zinc oxide nanoparticles didn't contained zinc oxide nanoparticles but zinc acetate. Surprisingly, in the autoclaved paper was detected the presence of zinc oxide nanoparticles. The papers that show higher antibacterial activities were carried out with membrane filtration of contaminated water samples and then it was performed the determination of the concentration of metal in the effluent by Flame Atomic Absorption Spectroscopy.

The results showed a bacterial reduction rate of 100% in water contaminated samples for *E. coli* NCTC 9001 and *E. faecalis* NCTC775 with papers containing zinc acetate in a concentration of 50 mM and in the paper containing silver nanoparticles and zinc acetate at a concentration of 10mM.

In order to validate all the work, the final part consisted in tests with filters that showed better properties, in contaminated water samples, and this work was done at the Laboratory of Water Consumption of Municipal Services Water and Sanitation in Almada.

Keywords: silver nanoparticles, zinc oxide nanoparticles, zinc acetate, antibacterial activity, water disinfection, bactericidal paper, *E.coli* NCTC 9001, *E.f* NCTC775, *S.a.* ATCC25923 e *E.coli* ATCC25922

LISTA DE ACRÓNIMOS

AC – Autoclave
DN – Ácido desoxirribonucleico
CENIMAT – Centro de Investigação de Materiais
DRX – Difracção de raios-X
E. coli – *Escherichia coli*
E.f – *Enterococcus faecalis*
EDS - Espectroscopia Dispersiva de raios - x
ERO – Espécies reactivas de oxigénio
Gram - - Gram negativa
Gram + - Gram positiva
IHMT – Instituto Higiene e Medicina Tropical
LAC – Laboratório de Águas de Consumo
MHA – *Muller-Hinton Agar*
NIR – Infravermelho próximo
NP – Nanopartícula
NPsAg – Nanopartículas de prata
NPsZnO – Nanopartículas de óxido de zinco
NPsAg e ZnO – Nanopartículas de prata e óxido de zinco
PG – Peptidoglicano
S. aureus – *Staphylococcus aureus*
SEM – Microscopia electrónica de varrimento
TG - Termogravimetra
UV – Ultra Violeta
UFC's – Unidades formadoras de colónias
Vis – Visível
Cu – Cobre
WO₃ – Óxido de tungsténio

LISTA DE SÍMBOLOS

[] - Concentração
h – Horas
H – Hidrogénio
H₂O – Água
HO• - Radical hidroxilo
I_C – Índice de cristalinidade
I_(am) – Intensidade de difracção
I₍₀₀₂₎ – Intensidade máxima observada
K – Factor de forma
M – Molar
ml – Mililitro
mm – Milímetro
mM – Milimolar
nm – Nanómetro
O – Oxigénio
rpm – Rotações por minuto
T – Temperatura
u.a. – Unidades arbitrárias
W – Watt
ZnO – Óxido de zinco
Zn(CH₃COO)₂ · 2H₂O Acetato de Zinco di-hidratado 2⁻ (20° C)
θ_{hkl} – Ângulo de difracção de Bragg
θ – Ângulo de incidência do feixe

ÍNDICE DE MATÉRIAS

1.Introdução	21
1.1.Água Potável – Um bem precioso	21
1.1.1.Microrganismos indicadores de água contaminada	21
1.1.2.Análise microbiológica de água	23
1.1.3.Métodos de tratamento de água descentralizados, de pequena-escala ou domésticos	23
1.1.4.Nanotecnologia – Contribuição para o tratamento de águas	24
1.2.Nanopartículas: Características, Propriedades e Síntese	25
1.2.1.Nanopartículas de Prata	26
1.2.2.Nanopartículas de óxido de zinco	27
1.2.3.Aplicações do papel funcionalizado com nanopartículas	28
1.3.Actividade anti-bacteriana	30
1.3.1.Tipos de testes Anti-Bacterianos	30
1.3.2.Mecanismos de Actuação das Nanopartículas	31
2.Materiais e Métodos	35
2.1.Síntese das nanopartículas	35
2.1.1.Síntese de nanopartículas de prata	36
2.1.2.Síntese de nanopartículas de óxido de zinco “ <i>in situ</i> ”	37
2.1.3.Síntese de nanopartículas de prata e óxido de zinco	37
2.2.Impregnação com nanopartículas	38
2.2.1.Nanopartículas comerciais	38
2.3.Realização de Testes Anti-Bacterianos	38
2.3.1.Materiais e Métodos	38
2.3.2.Procedimento Experimental	39
2.4.Filtração por Membrana	40
2.4.1.Materiais e Procedimento Experimental	40
3.Técnicas de Caracterização	43
3.1.Caracterização Morfológica	43
3.1.1.Microscopia Electrónica de Varrimento (<i>Scanning Electron Microscopy – SEM</i>)	43
3.2.Caracterização Óptica e Estrutural	44
3.2.1.Espectroscopia Dispersiva de raios-x (<i>Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>)	44
3.2.2.Espectroscopia de absorção Uv-Visível (<i>UV-Visible Spectroscopy</i>)	44
3.2.3.Difracção de raios-X (<i>X-Rays Diffraction, XRD</i>)	45
3.3.Caracterização Térmica	46
3.3.1.Termogravimetria (<i>Thermal Analysis, TA</i>)	46
3.3.2.Calorimetria Diferencial de Varrimento (<i>Diferencial Scanning Calorimetry, DSC</i>)	46
3.4.Técnicas de Análise Elementar	47
3.4.1.Espectroscopia de Absorção Atómica de Chama (<i>Flame Atomic Absorption Spectroscopy, FAAS</i>)	47
4.Discussão e Apresentação de Resultados	49
4.1.Caracterização dos substratos de papel	49
4.1.1.Caracterização Morfológica	49
4.1.2.Caracterização Estrutural	50
4.1.3.Caracterização Térmica	51
4.2.Caracterização do papel funcionalizado com nanopartículas	52
4.2.1.Caracterização do papel funcionalizado com Nanopartículas de Prata	52
4.2.2.Caracterização do papel funcionalizado com np's de óxido de zinco	59
4.2.3.Caracterização do papel funcionalizado com nanopartículas de prata e óxido de zinco	64
4.2.4.Caracterização do papel funcionalizado com np's comerciais	68
4.3. Estudo da actividade anti-bacteriana dos papéis funcionalizados com as nanopartículas	70
4.3.1.Estudo da actividade anti-bacteriana dos papéis funcionalizados com as nanopartículas de prata	71
4.3.2.Estudo da actividade anti-bacteriana dos papéis funcionalizados com as np's de óxido de Zinco	75
4.3.3.Estudo da actividade anti-bacteriana dos papéis funcionalizados com as np's de prata e óxido de zinco	79
4.3.4.Estudo da actividade anti-bacteriana dos papéis funcionalizados com as np's comerciais	80

4.4.Prova de Conceito – Validação Experimental	81
5.Conclusões e Perspectivas Futuras.....	89
6.PerspectivasFuturas.....	86
Bibliografia	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. População com acesso a fontes de água de consumo melhoradas em 2012 adaptado de (“Drinking Water and Sanitation Progress on,” 2014).	21
Figura 1.2. Estrutura cristalina hexagonal (wurtzite) do ZnO (http://whatiszincowide.weebly.com/structure.html).	28
Figura 1.3. Arranjo das fibras celulósicas, microfibrilas e celulose na parede celular da célula de origem vegetal. Adaptado de http://preuniversity.grkraj.org/html/1_CELL_STRUCTURE.htm	29
Figura 1.4. Método de difusão em agar – Kirby-Bauer (http://www.apcontinuada.com/es/el-antibiograma-interpretacion-del-antibiograma/articulo/80000504/)	31
Figura 1.5. Método de difusão em agar – E-test (http://www.apcontinuada.com/es/el-antibiograma-interpretacion-del-antibiograma/articulo/80000504/)	31
Figura 1.6.a) Bactéria Gram-positiva (Gram +) (Hajipour et al., 2012)	32
Figura 1.6.b) Bactéria Gram-negativa (Gram -) (Hajipour et al., 2012)	32
Figura 1.7. Esquematização das possíveis interações das np's com as células bacterianas	33
Figura 2.1. Esquematização do procedimento experimental.	35
Figura 2.2. Ilustração da montagem experimental para a síntese de np'sAg via citrato de sódio.	37
Figura 2.3. Imagens SEM de <i>E.coli</i> (à esq.) e de <i>E. faecalis</i> obtidas através de microscopia electrónica de varrimento existente no CENIMAT/I3N	38
Figura 2.4. Padrões de Mcfarland	39
Figura 2.5. Meios selectivos para crescimento de <i>E.coli</i> (meio vermelho) e <i>E.faecalis</i> (amarelo)	40
Figura 2.6. Dispostivos usados na filtração da amostra contaminada com as membranas contendo as np's.	41
Figura 2.7. Membrana nanométrica da marca millipore.	41
Figura 2.8. Câmara de fluxo laminar com evidência para a rampa de filtração.	41
Figura 3.1. Equipamento Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB disponível no CENIMAT/I3N	43
Figura 3.2. Imagem SEM de uma amostra de papel e respectivo espectro dispersivo de raios-X.	44
Figura 3.3. Espectrofotómetro PerkinElmer UV/Vis/Nir Lambda 95 disponível no CENIMAT/I3N	45
Figura 3.4. a) Representação esquemática do princípio de funcionamento do DRX (lei de Bragg) e b) Difractogramas típicos de materiais cristalinos e amorfos (adaptado de (“Cunha_2013 vs,” n.d.)	45
Figura 3.5. Equipamento de difracção de raios-X X'Pert PRO da PANalytical,	46
Figura 3.6. Analisador Térmico STA 449 F3 Jupiter disponível no CENIMAT/I3N.	47
Figura 3.7. Espectrofotómetro de Absorção Atómica SOLAAR Thermo Electron Corporation M Series, com chama de acetileno/ar	48
Figura 4.1. Discos comerciais.	49
Figura 4.2. Imagens SEM do papel de filtro de café (A1) e do disco comercial (B1)	49
Figura 4.3. Difractogramas obtidos para os dois substratos de papel usados na realização experimental: à esquerda: papel de filtro de café e à direita: disco comercial	50
Figura 4.4. Calorimetria diferencial de varrimento realizada para os dois papéis : à esq. para o papel de filtro de café e à dir. para o disco comercial	51
Figura 4.5. Termograma realizados para os dois substratos de papel: : à esq. para o papel de filtro de café e à dir. para o disco comercial	52
Figura 4.6. Imagens SEM do papel filtro de café resultante da síntese de np's “in situ” via citrato de sódio para [AgNO ₃] = 1mM (C1) e 10mM (C2) e com o borohidreto de sódio (B1 e B2)	53
Figura 4.7. Difractogramas para À esq: o papel de filtro de café com np'sAg cuja concentração de precursor, AgNO ₃ , varia de 1 e 10mM via citrato “in situ” ; à dir: papel de filtro de café com npAg de concentração 1 e 10 mM	54
Figura 4.8. Calorimetria diferencial de varrimento (à esq.) e análise termogravimétrica (dir.) para o papel de filtro de café, papel de filtro de café com npAg com [AgNO ₃] = 1 e 10mM via citrato “in situ”	55
Figura 4.9. Imagens SEM do papel de filtro de café impregnado durante 30 minutos com a suspensão de np'sAg com [AgNO ₃] 1mM com citrato de sódio (C1) e B1 com a suspensão de npAg com [AgNO ₃] de concentração 1mM com borohidreto de sódio	55
Figura 4.10. Imagens SEM do papel de filtro de café com npAg com [AgNO ₃] = 10mM com citrato de sódio (à esq.) por ordem crescente de tempo de impregnação: C10, C20 e C30 correspondem a 10, 20 e 30 min, respectivamente e com borohidreto de sódio (à direita)	56
Figura 4.11. Espectros de Absorvância para as suspensões de np'sAg via citrato de sódio (à esq.) e para as suspensões via borohidreto de sódio (à direita)	57

Figura 4.12. Difractogramas para o papel de filtro de café impregnado por diferentes tempos com a suspensão de npAg com $[AgNO_3] = 1 \text{ mM}$ via citrato (à esq) e para o papel de filtro de café impregnado com suspensão de npAg com $[AgNO_3] = 1 \text{ mM}$ via borohidreto de sódio (à dir.).....	58
Figura 4.13. Difractogramas para o papel de filtro de café impregnado por diferentes tempos com a suspensão de npAg com $[AgNO_3] = 10 \text{ mM}$ via citrato (à esq) e para o papel de filtro de café impregnado com suspensão de npAg com $[AgNO_3] = 10 \text{ mM}$ via borohidreto de sódio (à dir.)....	58
Figura 4.14. Calorimetria diferencial de varrimento (à esq.) e análise termogravimétrica (dir.) para o papel de filtro de café.	59
Figura 4.15. Ilustração das imagens SEM para os papéis contendo ZnO, de 1, 5, 50 e 100 mM, em diferentes condições : A - sem esterelização; B – com autoclavagem ; C – esterelizados por luz uv	60
Figura 4.16 Difractograma do papel filtro de café sem nada e com os papéis impregnados com as diferentes concentrações da mistura reaccional, onde os asteriscos (*) representam os picos relativos à celulose do tipo I, os quadrados pretos os picos referentes ao acetato de Zinco e os quadrados cinzentos os picos do acetato de zinco di-hidratado.	62
Figura 4.17. Á Esquerda: Difractograma do papel filtro de café sem nada, esterelizado por autoclave, e dos papéis impregnados com as diferentes concentrações de np'sZnO, tendo sido autoclavados, onde os quadrados pretos representam os picos referentes ao óxido de Zinco e os asteriscos os picos relativos à celulose do tipo I.	62
Figura 4.18. Difractograma do papel filtro de café sem nada e com os papéis impregnados com as diferentes concentrações da mistura reaccional, esterelizados por radiação UV, onde os asteriscos (*) representam os picos relativos à celulose do tipo I, os quadrados pretos os picos referentes ao acetato de Zinco e os quadrados cinzentos os picos do acetato de zinco di-hidratado.	63
Figura 4.19. Análise termogravimétrica para os vários papéis contendo a mistura reaccional de acetato de zinco em acetona.	64
Figura 4.20. Imagens SEM para A) papel de filtro de café com np'sAg e acetato de zinco sem esterelização ; B) papel de filtro de café com np'sAg/ZnO autoclavado e C) papel de filtro de café com np's Ag e acetato de zinco esterelizado com radiação UV.	65
Figura 4.21. Difractogramas para os três papéis onde se fez a síntese de np'sAg via citrato, "in situ", seguida da síntese de np'sZnO.	66
Figura 4.22. Espectro de EDS para o papel de filtro de café com np'sAg e acetato de zinco sem esterelização.	67
Figura 4.23. Espectro de EDS para o papel de filtro de café com Ag/ZnO com esterelizado por autoclave.	67
Figura 4.24. Espectro de EDS para o papel de filtro de café com np'sAg e acetato de zinco com esterelização uv.	68
Figura 4.25. Papel de filtro de café impregnado numa suspensão de 100mm np'sZnO comerciais. .	69
Figura 4.26. Papel de filtro de café impregnado numa suspensão de 100 mM np'S WO ₃ comerciais.	69
Figura 4.27. Papel de filtro de café impregnado numa suspensão de 100 mM np'SCu comerciais. ..	69
Figura 4.28. Difractogramas obtidos para o pó de np'sZnO comerciais, para o papel de filtro de café impregnado na suspensão das np'sZnO e para a suspensão comercial.....	70
Figura 4.29. Difractogramas obtidos para o pó de np'S WO ₃ comerciais, para o papel de filtro de café impregnado na suspensão das np'S WO ₃	70
Figura 4.30. Difractogramas obtidos para o pó de np'SCu comerciais, para o papel de filtro de café impregnado na suspensão das np'SCu.....	70
Figura 4.31. Representação gráfica do diâmetro do halo de inibição em função da concentração para a metodologia "in situ", via citrato de sódio (esq.) e via borohidreto de sódio (dir.)	72
Figura 4.32. Representação gráfica do diâmetro do halo de inibição em função do tempo de impregnação do papel na suspensão de np'sAg, via citrato de sódio (esq.) e via borohidreto de sódio (dir.).....	73
Figura 4.33. Ilustração gráfica dos halos de inibição em função da concentrações de acetato de zinco em acetona, no papel.....	75
Figura 4.34. Ilustração gráfica dos halos de inibição em função da concentrações de np'sZnO presentes nos papéis que foram autoclavados.	77
Figura 4.35. Ilustração gráfica dos halos de inibição em função da concentrações de acetato de zinco em acetona presentes nos papeis que foram esterelizados por radiação UV.	78

Figura 4.36. Ilustração gráfica dos halos de inibição em função do diâmetro do halo de inibição , formado no papel com np'sAg e acetato de zinco de concentração de 10 mM sem esterelização, para as diferentes bactérias	79
Figura 4.37. Ilustração gráfica dos halos de inibição em função do diâmetro do halo de inibição formado no papel com np'sAg e acetato de zinco, de concentração 10 mM, com esterelização com radiação UV para as diferentes bactérias	80
Figura 4.38. Ilustração gráfica dos halos de inibição em função do diâmetro do halo de inibição formado no papel com np'sAg e ZnO, de concentração 10 mM, com esterelização autoclave para as diferentes bactérias	80
Figura 4.39. Em cima: controlo positivo e resultados decorrentes das filtrações com as membranas de 10, 50 e 100 mM de acetato de zinco para <i>E.coli</i> ; e (em baixo) para <i>E. faecalis</i>	81
Figura 4.40. Lenticulas	82
Figura 4.41. Peptona Salina	82
Figura 4.42. Ilustração dos resultados mencionados na Tabela 4.21 , para <i>E. faecalis</i>	87
Figura 4.43. Ilustração dos resultados mencionados na Tabela 4.21 , para <i>E. coli</i>	87

INDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Tipos de Nanomateriais mais utilizados no tratamento de água para desinfecção	25
Tabela 1.2. Aplicações do papel funcionalizado com diferentes tipos de np's.	29
Tabela 1.3. Descrição da acção anti-bacteriana de agentes anti-bacterianos e respectivo mecanismo	30
Tabela 4.1. Percentagens Mássica e atômica dos elementos presentes espectro de EDS.	67
Tabela 4.2. Percentagens Mássica e Atômica dos elementos presentes no espectro de EDS.	67
Tabela 4.3. Percentagens Mássica e Atômica dos elementos presentes no espectro de EDS.	68
Tabela 4.4. Demonstração dos testes anti-bacterianos realizados para o papel de filtro de café	71
Tabela 4.5. Ilustração do resultado dos testes anti-bacterianos realizados com os papéis onde foi realizada a síntese de np'sAg "in situ", via citrato de sódio.	72
Tabela 4.6. Ilustração do resultado dos testes anti-bacterianos realizados com os papéis onde foi realizada a síntese de np'sAg "in situ", via borohidreto de sódio.	72
Tabela 4.7. Representação do diâmetro do halo de inibição em função da concentração para o papel de filtro de café com metodologia "in situ", via citrato de sódio com esterelização por autoclave e por radiação UV.	73
Tabela 4.8. Testes anti-bacterianos realizados com os papéis impregnados na suspensão de npAg com [AgNO ₃] = 1 mM via citrato de sódio.	74
Tabela 4.9. Testes anti-bacterianos realizados com os papéis impregnados na suspensão de npAg com [AgNO ₃] = 1 mM via borohidreto de sódio.	74
Tabela 4.10. Testes anti-bacterianos realizados com os papéis impregnados na suspensão de npAg com [AgNO ₃] = 10mM via citrato de sódio.	74
Tabela 4.11. Testes anti-bacterianos realizados com os papéis impregnados na suspensão de npAg com [AgNO ₃] = 10mM via borohidreto de sódio.	74
Tabela 4.12. Resultados dos testes anti-bacterianos para os papéis com as várias concentrações da mistura reaccional de acetato de zinco em acetona	75
Tabela 4.13. Resultados dos testes anti-bacterianos para os papéis com as várias concentrações e np'sZnO que foram autoclavados	77
Tabela 4.14. Resultados dos testes anti-bacterianos para os papéis com as várias concentrações da mistura reaccional de acetato de zinco em acetona esterelizados por radiação UV.	78
Tabela 4.15. Resultados dos halos de inibição observados para os papéis contendo [Ac.Zinco/H ₂ O] = 10 mM, sem esterilização, autoclavados e esterilizados por radiação UV.	78
Tabela 4.16. Resultados anti-bacterianos para os papéis impregnados com as suspensões de np's comerciais.	80
Tabela 4.17. Resultados decorrentes dos ensaios efectuados com as três membranas sobrepostas de Acetato de Zinco = 10, 50 e 100 mM.	83
Tabela 4.18. Resultados decorrentes dos ensaios efectuados com as membranas virgens, de acetato de Zinco = 10, 50 e 100 mM e com a membrana com [np'sAg] = 10 mM.	84
Tabela 4.19. Resultados decorrentes dos ensaios efectuados com as membranas virgens	85
Tabela 4.20. Resultados decorrentes dos ensaios efectuados com os filtros [Ag/Zn] = 10 mM.	86
Tabela 4.21. Resultados decorrentes dos ensaios efectuados com os filtros [Ag/Zn] = 10 mM.	86

1. INTRODUÇÃO

1.1 Água Potável – Um bem precioso

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 1/6 da população mundial, ou seja, cerca de 884 milhões de pessoas, não têm acesso a água potável, prevendo-se que com o aumento da população em 80 milhões de pessoas/ano, a procura de água aumente em cerca de 64 bilhões m³/ano, em 2050 prevê-se que 90% da população dos países em desenvolvimento não tenha acesso a água potável nem a saneamento básico (Margarida & Gomes, 2011)

A água é um bem essencial à vida, e atendendo à realidade atual, torna-se urgente o desenvolvimento de sistemas de tratamento de água com características adequadas às condições locais, tanto a nível de qualidade de água, como a nível económico.

Entre 1990 e 2012, 2,3 bilhões de pessoas passou a ter acesso a uma fonte melhorada de água potável, restando apenas três países (República Democrática do Congo, Moçambique e Papua Nova Guiné) em que apenas menos de metade da população tinha acesso a uma fonte de água potável. Noutros 35 países, 26 dos quais se encontram na sub-África Subsaariana, a cobertura de um melhor abastecimento de água potável foi entre 50% e 75%. Já na América Latina e no Caribe, os mais baixos níveis de cobertura são encontrados na República Dominicana, Equador, Haiti, Nicarágua e Peru (Figura.1.1.) (“Drinking Water and Sanitation Progress on,” 2014).

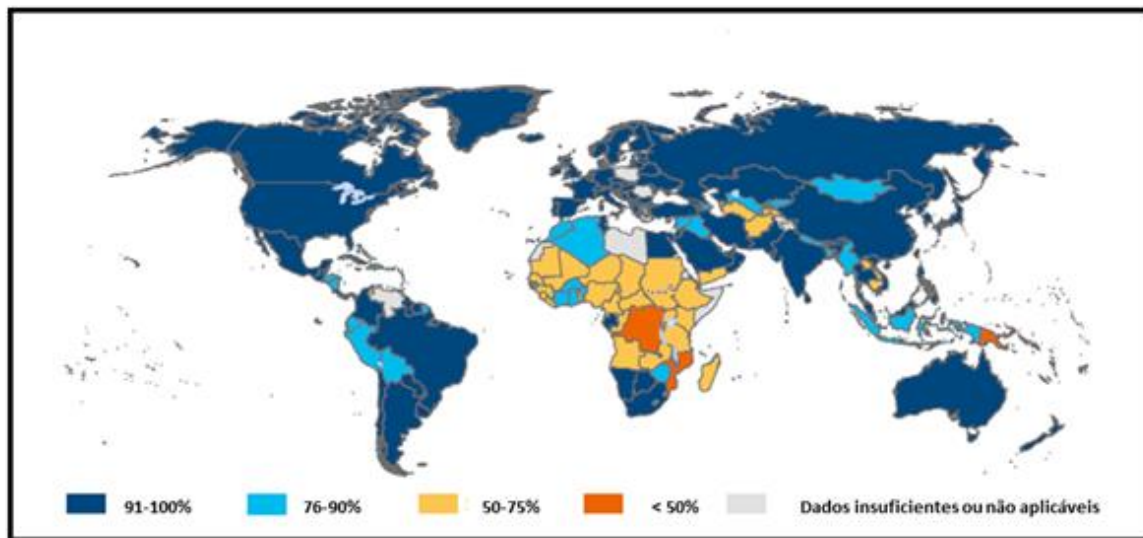


Figura 1.1. População com acesso a fontes de água de consumo melhoradas em 2012 adaptado de (“Drinking Water and Sanitation Progress on,” 2014).

Assim, intervenções que melhorem a qualidade da água a ser consumida oferecem grandes benefícios para a saúde pública, nomeadamente sistemas de tratamento de água descentralizados, de pequena-escala ou domésticos. A principal pré-condição para a aplicação de tecnologias descentralizadas para melhorar a qualidade da água é a preocupação ativa por parte das famílias, líderes comunitários e organizações não-governamentais locais. Quando a ligação entre a água e a doença é estabelecida/confirmada, a escolha de uma solução depende dos costumes locais, da disponibilidade da informação e recursos, assim como o mercado e a escala necessária. (Peter-Varbanets, Zurbrugg, Swartz, & Pronk, 2009)

1.1.1.Microrganismos indicadores de água contaminada

Ao avaliar a qualidade/viabilidade da água a ser consumida há que atender ao facto de esta poder conter vários tipos de microrganismos, entre os quais saprófitas, cujo habitat natural é o solo, a própria água ou ar e microrganismos patogénicos, como resultado da contaminação por esgotos domésticos, onde se encontram matérias fecais, donde provém muitos agentes causadores de doenças – agentes patogénicos. (“Qualidade da Água e Saúde Pública,” n.d.)

No entanto, a pesquisa directa destes agentes não é realizada por rotina em laboratório uma vez que a identificação de todos os microrganismos que podem estar presentes na água de consumo é praticamente impossível pois tem custos muito elevados (Almeida, 2007), alguns microrganismos patogénicos estão presentes na água em pequena quantidade, outros permanecem viáveis por curtos períodos de tempo fora do organismo hospedeiro, e também podem sofrer transições para formas mais resistentes que são viáveis mas não cultiváveis, podendo permanecer neste estado por longos períodos (endósporos de bactérias). (“Qualidade da Água e Saúde Pública,” n.d.)

Neste contexto, para avaliar a viabilidade da água a ser consumida recorre-se a organismos indicadores de contaminação fecal.

Os organismos indicadores são microrganismos indicadores de poluição fecal em água contaminada, incluindo-se nestes as bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes totais e *Enterococcus faecalis*. (Drinking-water, n.d.-a) Estas residem no intestino humano ou animal estando, portanto, presentes em grande número nas fezes humanas e de animais (assim como em efluentes). (Parte, 2013)

O grupo de coliformes totais inclui tanto espécies fecais como ambientais, podendo-se subdividir em coliformes fecais e *E.coli*. Este grupo pertence à família *Enterobacteriaceae*, sendo um grupo de bactérias muito semelhantes entre si, com forma de bacilus, Gram-negativas, não formadoras de esporos, aeróbias ou anaeróbias facultativas (De, n.d.) capazes de fermentar lactose com produção de ácido ou aldeído após 24h a 35-37 °C. (Drinking-water, n.d.-a)

Dentro do grupo dos Coliformes totais tem-se o grupo das bactérias coliformes fecais ou termotolerantes. Estas diferenciam-se do grupo inicial pela sua capacidade de fermentar a lactose a uma temperatura ligeiramente superior – 44,5° C - e também pela presença da enzima β- galactosidase. A *E.coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter* constituem este grupo, no entanto, apenas a primeira é a que tem como origem exclusiva o intestino humano e de animais. (Duarte & Horizonte, 2011)

Actualmente, a *E.coli* é considerada como o indicador fecal de excelência, uma vez que tem sido demonstrado que é um indicador mais específico quando comparada com os indicadores termotolerantes (Odonkor & Ampofo, 2013).

Apesar da maioria das bactérias *E. coli* serem inofensivas, algumas estirpes são patogénicas, (“Coliform Bacteria and Drinking Water,” 2011) estando assim a bactéria associada a doenças diarreicas pelo mundo inteiro e também por ser responsável por infecções urinárias. (Almeida, 2007)

A sua identificação é então realizada em amostras de água em que os procedimentos efectuados se baseiam na produção de gás ou ácido (partindo da lactose) ou a produção da enzima β -glucuronidase. Os procedimentos incluem filtração por membrana seguidos da incubação das membranas sobre meios selectivos a uma temperatura de 44-45 °C , efectuando-se a contagem das unidades formadoras de colónias após 24 horas. (Drinking-water, n.d.-a)

Os enterococos fecais começaram a ser usados como indicadores de contaminação fecal por volta de 1900. (Almeida, 2007)

Estas bactérias são Gram-positivas, relativamente tolerantes ao cloreto de sódio e a pH alcalino, sendo anaeróbias facultativas. (Drinking-water, n.d.-a)

O grupo de enterococos fecais inclui *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. gallinarum* e *S. avium*.

Os enterococos fecais geralmente não são considerados patogénicos, no entanto algumas estirpes de *E. faecalis* estão associadas a infecções humanas.

Estes microrganismos são mais resistentes que os coliformes fecais à salinidade. Em águas salobras e salinas, a taxa de morte dos enterococos fecais é mais reduzida, sendo indicadores mais credíveis que os coliformes fecais nestas águas. (Almeida, 2007)

No entanto, estes indicadores apresentam algumas limitações, sendo uma delas a sua incapacidade de distinguir a origem da fonte de poluição, se animal ou humana. Segundo os autores (Meays, Broersma, Nordin, & Mazumder, 2004) era costume recorrer aos índices de coliformes fecais / estreptococos fecais (FC / FS) para avaliar a origem de poluição fecal da água, em que o índice FC / FS > 4 indicava contaminação por fezes de seres humanos, FC / FS entre 0,1 e 0,6, com contaminação por animais domésticos e por fim FC / FS < 0,1, indicava contaminação por animais selvagens. No entanto, a utilização da razão FC / SF começou a ser questionada pela dificuldade de usar em ambientes agrícolas, e também devido à variação das taxas de sobrevivência das espécies do grupo de enterococos. Este rácio pode ser utilizado com segurança nos resultados obtidos em amostras

de água colhidas perto do local da descarga contaminante e logo após essa descarga não sendo, portanto, um método viável. (Almeida, 2007)

À semelhança da *E. coli*, as técnicas de identificação/quantificação compreendem a técnica de filtração por membrana e a técnica dos Tubos Múltiplos; Em relação à primeira técnica, a diferença reside no tipo de meio de cultura e nas horas de incubação, que neste caso são 48 horas. No que diz respeito à segunda técnica, a detecção é feita pela capacidade destes enterococos para hidrolisar o 4-metil- β -D-glucósido na presença de acetato de tálio e ácido nalidíxico no prazo de 36 horas a uma temperatura de 41 °C. (Drinking-water, n.d.-a)

Assim, o conceito de utilização de organismos tais como *E. coli* como indicadores de contaminação fecal é uma prática bem estabelecida na avaliação da qualidade da água potável. Os critérios determinados para tais indicadores fecais são de que eles não devem ser os próprios agentes patogénicos e estes devem estar presentes nas fezes de humanos e animais, e em grande número; não se devem multiplicar em águas naturais; devem persistir na água de um modo semelhante aos patógenos fecais, estarem presentes em maior número do que os patógenos fecais assim como responder a processos de tratamento de uma forma similar a patógenos fecais e por fim, serem facilmente detectados por métodos de cultura simples de baixo custo. (Drinking-water, n.d.-b)

1.1.2 Análise microbiológica de água

De forma a avaliar se a água é viável para consumo, há que analisar a água não só em termos microbiológicos, mas também físico-químicos.

No que diz respeito à análise microbiológica, esta pode ser feita recorrendo basicamente a duas técnicas/métodos: A Técnica de Tubos Múltiplos ou a técnica da Filtração por Membrana. (FM)

Esta última, foi introduzida na década de 1950 como uma alternativa à Técnica de Tubos Múltiplos, já que apresenta como vantagem o facto de isolar colónias discretas de bactérias; já em relação à primeira técnica esta para além de indicar a presença ou ausência de microrganismos indica também o nº mais provável dos mesmos (indicado pela turvação dos tubos de ensaio) (Technique & Benefits, 1978)

Assim, ao colocar uma membrana estéril (cujos poros variam de 0,2 a 0,45 μ m) num dispositivo de filtração, com chama ou em câmara de fluxo laminar de forma a garantir uma atmosfera estéril, e depois fazer-se passar um certo volume de amostra sob posterior aplicação de vácuo, o volume vai ser aspirado através da membrana.

Devido à sua porosidade, todos os microrganismos presentes na amostra vão ficar retidos nesta, que vai depois ser transferida para um meio de cultura adequado, previamente preparado numa caixa de Petri.

Esta caixa de Petri vai ser colocada numa estufa, a temperatura e tempo específicos (estes parâmetros variam consoante o tipo de microrganismos), de forma a proporcionar as condições ótimas para o crescimento das estirpes envolvidas.

Por fim, com a formação das colónias faz-se a contagem e os resultados são expressos em termos de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) /100 mL.

Apesar de esta técnica ser de fácil e rápida execução, fiável e reproduzível apresenta como desvantagens o facto de não poder ser utilizada em águas muito turvas (pois a colmatação da membrana é rápida, mesmo com pouco volume) e a sua limitação na sua implementação, uma vez que o custo das membranas é elevado não sendo acessível em alguns países. (Samplinganalysis, n.d.)

1.1.3. Métodos de tratamento de água descentralizados, de pequena-escala ou domésticos

As tecnologias de tratamento de água na zona de uso/consumo (domésticas) direccionadas para a descontaminação de microrganismos têm sistemas baseados na temperatura e na radiação UV, como o aquecimento da água, a radiação solar, o sistema SODIS (*Solar Water Desinfection*), baseado na ação combinada do aquecimento e radiação solar, e lâmpadas UV, enquanto que os métodos de tratamento químicos compreendem a coagulação, floculação e precipitação, assim como a desinfecção química através do cloro, quer na forma líquida ou em forma de pó.

Por fim, os métodos de remoção física incluem essencialmente a sedimentação e a filtração. (Peter-Varbanets et al., 2009)

Estes surgiram como uma nova abordagem de tratamento, permitindo às pessoas e às comunidades sem acesso a água potável melhorarem a qualidade da água captada que esteja contaminada, tratando-a e assim evitar doenças e consequentemente mortes por microrganismos patogénicos presentes na água. No entanto apesar da variedade destas tecnologias, à exceção da ebulição, nenhuma delas alcançou utilização em grande escala.

Algumas tecnologias e sistemas específicos deste tipo de tratamento foram desenvolvidos, descritas e avaliadas para uso doméstico baseados em vários critérios de desempenho. Além da eficácia na melhoria da qualidade microbiológica da água e dos custos do sistema, esses critérios de desempenho incluem a facilidade de utilização do sistema ou tecnologia, a sua sustentabilidade ambiental, aceitabilidade sociocultural e potencial de disseminação (que também inclui a disponibilidade de pessoal qualificado capaz de fornecer reparos, a disponibilidade de peças de reposição ou manutenção necessária em geral), e principalmente que seja independente de energia.

Um dos sistemas de tratamento doméstico, ou de pequena-escala mais comum inclui o uso de filtros.

Os filtros mais usados para o tratamento podem ser classificados em dois grupos, os filtros de membrana, cerâmica porosa ou compósito, sendo filtros com tamanhos de poros bem definidos, onde se incluem também os filtros de carvão activado. A separação dá-se então através de uma superfície/membrana porosa, que vai reter e/ou excluir os microrganismos de acordo com o seu tamanho molecular. (Drinking-water, n.d.-b)

O outro grupo compreende os filtros de meio granular, os filtros de areia e os filtros “biosand” (BSA). Estes dois tipos de filtros de meio granular diferem no modo de operação, sendo que o segundo tem um modo de operação mais lento formando uma camada bioativa responsável pela remoção dos microrganismos causadores de doenças. (Loo, Fane, Krantz, & Lim, 2012)

Actualmente, e atendendo aos países desenvolvidos, as membranas são consideradas como as mais importantes componentes da purificação de água moderna, tratamento de água e tecnologias de dessalinização. (Dhakras, 2011)

Com o rápido crescimento da Nanotecnologia, começou a surgir interesse nas aplicações dos nanomateriais no meio-ambiente, uma vez que tem sido demonstrado que estes têm fortes propriedades antimicrobianas, (Li et al., 2008) sendo um ponto fulcral para a sua utilização no tratamento de águas.

1.1.4. Nanotecnologia – Contribuição para o tratamento de águas

A Nanotecnologia tem sido descrita como uma das tecnologias mais promissoras para a desinfecção de água (Mohmood et al., 2013) através do uso de nanoadsorventes, nanocatalizadores, nanopartículas bioativas, membranas catalíticas nanoestruturadas, assim como nanopartículas que melhorem a filtração (Ngwenya, Ncube, & Parsons, 2013). Na tabela 1.1 podem-se ver exemplos destes nanomateriais/nanoestruturas assim como o seu contributo no tratamento de águas. Os nanotubos de carbono, zeólitos e dendrímeros também contribuem para o desenvolvimento de processos de filtração de água, sendo mais efectivos no que diz respeito à relação custo-eficácia. (Dhakras, 2011)

Tal facto deve-se às extraordinárias propriedades dos nanomateriais, tais como grande área superficial, fotossensibilidade, propriedades electroquímicas, ópticas e magnéticas, assim como atividades catalíticas e antimicrobianas entre outras, proporcionam características muito úteis para o tratamento de água. (Qu, Brame, Li, & Alvarez, 2013)

Assim sendo, os nanomateriais com propriedades antimicrobianas podem ser usados para construir sistemas de alto desempenho de tratamento de água doméstico ou a pequena-escala. (Li et al., 2008)

Em particular, os usos/ contribuição da Nanotecnologia em membranas/ filtros passam pela fabricação de membranas/ filtros nanorreactivas (os), sendo funcionalizadas (os) com nanopartículas que por um lado melhoram o processo de filtração por se ligarem de forma selectiva aos contaminantes alvo (Dhakras, 2011) e por outro têm já capacidades bactericidas, sendo capazes de desinfectar a água matando as bactérias presentes em água contaminada. (Dankovich & Gray, 2011)

Também as membranas nanoestruturadas, isto é, membranas que fornecem uma base para uma separação física via nanofiltração como os nanotubos de carbono e matrizes nanocapilares têm sido uma das contribuições desta ciência para o tratamento de água. (Dhakras, 2011)

Tabela 1.1. Tipos de Nanomateriais mais utilizados no tratamento de água para desinfecção

Tipo de Nanoestrutura	Tipo de Material	Contribuição para tratamento de águas	Referência
Nanocatalizadores	ZnO	Actividade fotocatalítica de NP's Pd em ZnO na remoção de <i>E.coli</i>	(Khalil, Gondal, & Dastageer, 2011)
Membranas catalíticas nanoestruturadas	Cu/ZnO e ZnO	Membranas que activadas por radiação UV demonstram forte actividade antibacteriana contra <i>E.coli</i> .	(Liu, Bai, & Sun, 2012) (Bai, Liu, & Sun, 2012)
Nanopartículas bioactivas	Ag, Ag/ZnO	Papel bactericida com NP'sAg e compósito com matriz de bentonite mostraram efeito antibacteriano contra <i>E.coli</i> e <i>E.faecalis</i> .	(Dankovich & Gray, 2011b) (Motshekga, Ray, Onyango, & Momba, 2013)
Dendrímeros	Poli (amidoamina) com Ag	Dendrimero polimérico com actividade antibacteriana demonstrada " <i>in vitro</i> "	(Tiwari, Behari, & Sen, 2008)

1.2 Nanopartículas: Características, Propriedades e Síntese

Em Nanotecnologia, uma partícula é definida como um pequeno objecto que se comporta como uma unidade na totalidade relativamente ao seu transporte e propriedades.

É classificada de acordo com o seu tamanho, em que as partículas mais pequenas estão na gama de 100 a 2500 nm, e as partículas ultra-pequenas são dimensionadas de 1 a 100 nm. (Sciences, 2010)

As nanopartículas são semelhantes a estas últimas, encaixando-se na mesma gama de tamanho.

A transição de micropartículas para nanopartículas pode levar a grandes mudanças nas suas propriedades físicas; entre os factores que causam mais impacto tem-se o aumento da área superficial relativamente ao volume, assim como o tamanho da partícula que se vai movendo para o domínio onde predominam os efeitos quânticos (Holister, n.d.)

No entanto, estas mudanças são mais evidentes quando as partículas apresentam um tamanho entre 1 e 10 nm, relacionando-se com o tipo de ligação química do cristal.

Este tipo de efeito quântico é importante pois permite explorar outras propriedades dos materiais. (Soares, 2013)

Apesar da exploração desta ciência nanométrica ser relativamente recente, a era das NPs já vem da Antiguidade, pois estas já tinham sido aplicadas nessa época tal como demonstrado com a Taça de Lycurgus. Esta continha nanopartículas de ouro, dispersas, e criava cores diferentes consoante o modo de iluminação: Caso a luz viesse de frente (em reflexão), tinha tonalidade verde, caso fosse iluminada por dentro (em transmissão), exibia uma cor vermelha.

Contudo, a causa deste efeito até ali então era desconhecida para aqueles que o observaram.

Não obstante, hoje já se sabe que a diferença de cores se deve ao efeito de ressonância plasmónica de superfície (*Surface Plasmon Ressonance-SPR*) ou Ressonância Plasmónica de Superfície Localizada (*LSPR*).

Este efeito define-se como uma oscilação espacial (coerente) resultante do acoplamento dos electrões da banda de condução da superfície da np metálica (As np's de metais nobres exibem uma forte banda de ressonância plasmónica na região do visível) que é excitada através de um campo eléctrico proveniente da luz incidente a uma dada frequência de ressonância. (Ci, 2009)

Assim, as propriedades electrónicas das np's, a forma e tamanho destas, a temperatura e o ambiente dieléctrico circundante da np são variáveis fundamentais na definição do comprimento de onda/cor da luz que consegue desencadear o efeito. ("Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR)," 2011)

A classificação das np's é feita de acordo com a sua dimensão, morfologia, composição, uniformidade e aglomeração.

Em relação à dimensionalidade, podem apenas ter uma dimensão (filmes finos ou revestimentos de superfície), duas dimensões (filmes nanoestruturados ou nanoestruturas ligadas a um substrato), ou três dimensões (incluindo np's com várias morfologias).

Relativamente à composição podem ser compostas por um só material ou serem um compósito contendo vários materiais (Sciences, 2010)

Apesar desta complexa classificação, geralmente as np's podem-se distinguir em três categorias: fulerenos, dendrímeros e pontos quânticos.

Enquanto os fulerenos são partículas esféricas ocas constituídas por 60 átomos de carbono, tendo muitas aplicações na electrónica e processos energéticos, os dendrímeros são estruturas poliméricas, tendo um especial foco na área da saúde.

Já os pontos quânticos são partículas que contêm electrões livres, o que os torna nanocristais semicondutores.

Por fim, têm-se as np's cerâmicas e metálicas, em que estas últimas têm tido aplicação em inúmeras áreas.

Existem vários métodos de sintetizar np's, no entanto, estes podem-se classificar em duas categorias: De "cima para baixo – top down" (métodos físicos) e de "baixo para cima – bottom-up" (métodos químicos ou biológicos), com o objectivo de obtenção de forma e tamanho desejados.

No entanto, a síntese de nanopartículas pode ser feita através de três vias principais:

- **Síntese por fase líquida** (precipitação, síntese por microondas, sol-gel, micro-emulsões e sínteses hidro e solvotermiais)
- **Síntese por fase gasosa** (pela supersaturação, obtida através da vaporização do material num gás de fundo, com posterior arrefecimento do gás)
- **Síntese por fase sólida** (pulverização por iões - método que usa precursores sólidos)

Por fim, entre os métodos que usam precursores líquidos ou gasosos incluem-se a síntese química por vapor, spray-pirólise, síntese fotoquímica, síntese térmica por plasma, e sínteses com reacções a baixas temperaturas. (Hu, Masuda, Ohji, & Kato, 2010)

1.2.1. Nanopartículas de Prata

Estas nanopartículas são uma escolha comum para os sistemas de tratamentos de água domésticos, ou de pequena escala devido ao seu forte e amplo poder antibacteriano, assim como o facto de apresentarem uma baixa toxicidade para os humanos (Qu et al., 2013) e para o ambiente, comparativamente com os métodos de tratamento convencionais.

Têm sido revelados os efeitos tóxicos das AgNP's em bactérias Gram positivas e Gram negativas e também em vírus. (Mijnendonckx, Leys, Mahillon, Silver, & Van Houdt, 2013) Neste sentido, as suas propriedades físico-químicas têm um papel importante na atividade antimicrobiana, pois, geralmente nanopartículas com menos de 10 nm são mais tóxicas para as bactérias, nomeadamente *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*; Já as NPAg de 1 a 10 nm inibem certos tipos de vírus. (Li et al., 2008) O seu poder biocida foi também evidenciado contra *Staphylococcus epidermis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella mobilis*, e *Klebsiellapneumonia*, entre outros. (Marambio-Jones & Hoek, 2010)

A atividade antimicrobiana de nano-Ag é largamente atribuída à libertação dos iões de prata, que atacam grupos funcionais cuja afinidade é elevada para estes. Como exemplos desses grupos tem-se o grupo tiol em proteínas e os fosfatos no ADN. Portanto a presença de ligandos de iões de prata (cloretos, sulfatos, fosfatos) desempenha um papel importante na biodisponibilidade e toxicidade das npAg's. No entanto como a dissolução das nanopartículas pode levar ao seu eventual esgotamento, o controle de libertação assim como estratégias de reabastecimento são cruciais para a eficácia de longo prazo. (Qu et al., 2013)

Existem vários métodos para a síntese de npAg's no entanto a síntese mais comum consiste na redução química de um sal de prata dissolvido em água com um composto redutor - que pode ser o borohidreto de sódio, o citrato, a glucose, hidrazina, e ascorbato, (Marambio-Jones & Hoek, 2010) e com um estabilizador, por exemplo o PVP (*polyvinyl pyrrolidone*), que previne a agregação. (Mijnendonckx et al., 2013) Uma das dificuldades deste método é controlar o tamanho das nanopartículas, no entanto, sabe-se que o uso de um redutor forte leva a pequenas partículas monodispersas, enquanto tamanhos maiores podem ser difíceis de controlar; já os redutores mais

fracos produzem uma reação mais lenta, pelo que as nanopartículas obtidas tendem a ser mais polidispersas em tamanho. (Marambio-Jones & Hoek, 2010)

Devido ao facto de os agentes redutores serem considerados tóxicos e perigosos para o ambiente, atualmente já se recorre a métodos de síntese de $\text{np}^{\circ}\text{Ag}$ “amigos do ambiente”. (Jagtap & Bapat, 2013)

Um dos tipos de filtros mais utilizados são os filtros de cerâmica, já por si eficientes. No entanto, tem sido demonstrada uma eficácia antibacteriana destes filtros quando impregnados com npAg° s a reduzir a quantidade de *E.coli* e outras bactérias na água para consumo (Lv et al., 2009) (Kallman, Oyanedel-Craver, Asce, Smith, & Asce, 2011) (Oyanedel-Craver & Smith, 2008)

Já os autores (Loo et al., 2013), desenvolveram um criogel de PVA/Ag que permitiu uma desinfecção rápida da água com uma libertação de Ag mínima. A capacidade antimicrobiana das npAg° s também foi utilizada na produção de outros sistemas de tratamento de água de pequena escala, entre os quais a produção de uma coluna de compósito de alginato (Lin et al., 2013) espuma de poliuretano (Jain & Pradeep, 2005) assim como em matrizes poliméricas com troca iónica (Alonso et al., 2013) e microsféricas poliméricas (Gangadharan et al., 2010)

Já um estudo feito por (Dankovich & Gray, 2011) visava criar um papel bactericida, através da impregnação das npAg° s, desativando assim as bactérias à medida que estas atravessavam o papel, em que, a água filtrada iria conter bactérias mortas. Os resultados mostraram que foi possível obter uma ação biocida à medida que as bactérias iam percorrendo o papel, sendo portanto um método barato e de fácil implementação por exemplo, numa emergência.

1.2.2. Nanopartículas de óxido de zinco

Dentro dos vários tipos de np° s existentes, as np° s de óxidos de metais devido à sua versatilidade, propriedades e funcionalidades, têm sido usadas nas mais diversas aplicações (Vaseem, Umar, & Hahn, 1988)

Assim, aplicações com np° s de óxido de zinco variam desde nanogeradores, sensores de gás, biossensores, células solares, varistores, fotodetectores e fotocatalizadores (Talam, Karumuri, & Gunnam, 2012)

No entanto, tem sido demonstrado que estas também possuem carácter anti-bacteriano.

É sabido que hoje em dia agentes anti-bacterianos são extremamente importantes para um considerável número de sectores industriais, nomeadamente para o sector ambiental, alimentar, têxtil, de embalagens, cuidados de saúde e médicos, podendo estes agentes ser orgânicos ou inorgânicos. A vantagem destes últimos reside no facto de serem muito estáveis a altas temperaturas e/ou pressões, e, para além disso, quando comparados com os antibióticos também são preferenciais, uma vez que são mais robustos e apresentam maior tempo de vida/duração (Raghupathi, Koodali, & Manna, 2011). Em particular, óxidos de metais têm sido alvo de estudo de muitos investigadores, especialmente o ZnO , dada a sua multi-funcionalidade (L. Zhang, Jiang, Ding, Povey, & York, 2007)

De facto, as propriedades anti-bacterianas do ZnO têm sido estudadas contra uma ampla gama de bactérias (patogénicas e não-patogénicas), tais como *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas*, etc (Sun et al., 2014), comprovando, de facto, a sua eficácia num grande espectro de microorganismos (Jones, Ray, Ranjit, & Manna, 2007)

Contudo, vários estudos foram feitos de modo a avaliar esta capacidade, variando alguns parâmetros, tais como forma das nanoestruturas, concentração, tamanho, entre outros, havendo unanimidade no que respeita à relevância da concentração e tamanho das np° s de ZnO : uma maior concentração e menor tamanho levam a uma maior eficácia antibacteriana (L. Zhang et al., 2007) (Bammidi, 2011) (Pasquet et al., 2014) (Yamamoto, 2001) (Pati et al., 2014) (Kołodziejczak-radzimska & Jesionowski, 2014)

Já em relação às aplicações das np° s de ZnO no tratamento de água, o seu poder anti-bacteriano foi também comprovado (Khalil, Gondal, & Dastageer, 2011), (Liu, Bai, & Sun, 2012), (Bai, Liu, & Sun, 2012), (Hotshekga, Ray, Onyango, & Momba, 2013) (Khamkure, Cervantes, Melo, & González, 2013) (J. Zhang, Zhang, & Zhang, 2014) (Baruah, Pal, & Dutta, 2012)

O óxido de zinco forma uma estrutura cristalina do tipo wurtzite - que é a estrutura termoninamicamente mais estável e portanto mais comum, uma estrutura hexagonal compacta, com dois parâmetros de rede, a e c , pertencendo ao grupo espacial $P6_3mc$. (**Figura 1.2.**)

Nesta estrutura cristalina os átomos (iões) de oxigénio são dispostos na estrutura hexagonal e os átomos (iões) de zinco compõem metade das posições intersticiais tetragonais, possuindo o mesmo

arranjo relativo dos átomos de oxigênio. Ambos os átomos de zinco e oxigênio são coordenados por quatro íons de carga oposta sendo a ligação química do tipo iônica. Devido à diferença de tamanho, estes íons ocupam apenas 44% do volume da célula unitária, deixando grandes espaços na rede (Doutorado, 2012).

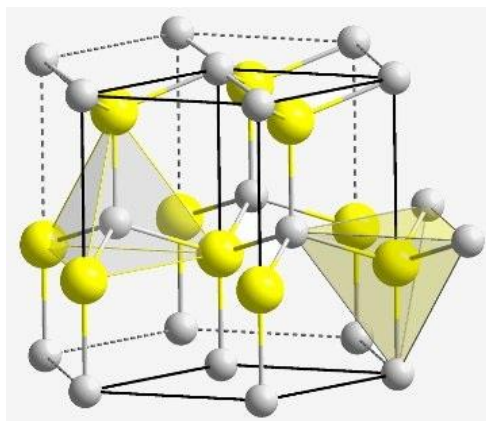


Figura 1.2. Estrutura cristalina hexagonal (wurtzite) do ZnO
(<http://whatiszincioxide.weebly.com/structure.html>)

A produção de nanopartículas a nível industrial é feita essencialmente por dois métodos: Processamento mecanoquímico – Mechanochemical Process (*MVP*) e síntese física por vapor - *Physical Vapor Synthesis (PVS)*. O primeiro método é barato e apresenta-se como uma metodologia simples de obter as np's a larga escala. (Kołodziejczak-radzimska & Jesionowski, 2014)

Relativamente à síntese física por vapor - *Physical Vapor Synthesis (PVS)*, a energia proveniente de um arco de plasma é aplicada a um precursor sólido de maneira a gerar vapor a alta temperatura.

Quando o precursor sólido é injectado no plasma, dão-se reacções que levam à supersaturação e nucleação das partículas, o que só é possível com a energia proveniente do plasma. Posteriormente, adiciona-se um reagente, um gás, ao vapor, que depois é arrefecido a uma velocidade controlada e condensado para formar as np's.

Os tamanhos destas variam de 8 a 75 nm. (Judith & Espitia, 2012).

Num contexto laboratorial, de pequena-escala, recorre-se a vários métodos de síntese, entre os quais decomposição térmica, precipitação, sol-gel e sínteses hidro e solvotermiais usando diferentes tipos de precursores.

Num estudo efectuado por (Sun et al., 2014) que consistia em avaliar as propriedades anti-bacterianas do ZnO partindo de diferentes sais zinco dopados com titânio verificou-se que o pó de zinco sintetizado a partir do cloreto de zinco foi o que exibiu melhor actividade anti-bacteriana, evidenciando a importância do precursor usado na síntese química assim como a relevância do tamanho das partículas e cristalinidade.

Assim, a escolha da metodologia a adoptar tem de ser feita de acordo com as características que se querem obter no produto final como, por exemplo, tamanho e forma, são parâmetros importantes para o tipo de aplicação a que se destinam.

1.2.3. Aplicações do papel funcionalizado com nanopartículas

■ O Papel

Por definição, tem-se o papel como um material fino e flexível, que é constituído por uma rede de fibras celulósicas naturais, sendo que estas apresentam diâmetros que variam de 10 a 50 nm. (Costa, 2012)

O papel é essencialmente constituído por celulose, hemicelulose e lenhina.

No entanto, a sua composição química depende da fonte de celulose e do tratamento químico ao qual a madeira foi submetida para produzir a pasta de papel. Quando a pasta de papel não é tratada quimicamente a sua composição é muito semelhante à composição da fonte de celulose.

Este polímero natural é o principal elemento estrutural da parede celular da grande maioria das plantas (**Figura 1.3**), devido ao seu elevado grau de polimerização e cristalinidade. É um polissacarídeo linear e homogêneo cujo monômero é β -1,4-D-glucopirranose.

O grau de cristalinidade da celulose depende da sua fonte, já que a celulose de algodão e de alguns tipos de algas apresentam uma elevada cristalinidade, e a celulose da madeira tende a ser menos cristalina, com índices de cristalinidade entre 50 e 90%.

Já a hemicelulose é formada por um conjunto heterogêneo de polissacarídeos com baixo grau de polimerização, desempenhando um papel importante na ligação entre a celulose cristalina e a lenhina amorfa, sendo são benéficas para as propriedades do papel.

A lenhina, por sua vez, é um polímero aromático com uma estrutura extremamente complexa que reforça e agrega o material fibroso da madeira, conferindo-lhe resistência mecânica e proteção contra microrganismos patogênicos, entre outras funções. (Costa, 2012) (Soares, 2013)

Apesar da sua complexidade, e com a sua inevitável associação com a impressão e escrita, o papel é um material é muito versátil, o que prova as variadíssimas aplicações (lenços, embalagens, filtros de café, etc).

Assim, aliando a sua disponibilidade e flexibilidade assim como a facilidade de manipulação aliadas à sua estrutura porosa e superfície fibrosa hidrofílica, que lhe vai permitir absorver suspensões de np's, mesmo com um volume baixo, este surgiu como um material de interesse na Nanotecnologia, como um suporte (ou matriz) para as nanopartículas metálicas, dadas as suas variadíssimas potencialidades.

Na **Tabela 1.2**, apresentam-se as aplicações do papel funcionalizado com alguns tipos de np's.

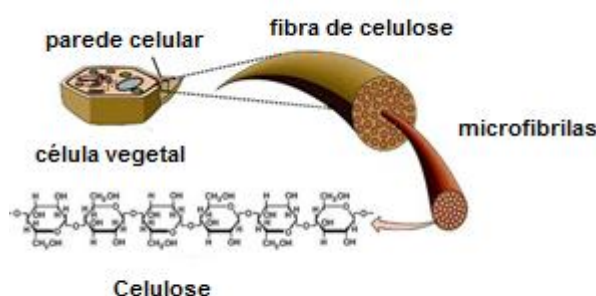


Figura 1.3. Arranjo das fibras celulósicas, microfibrilas e celulose na parede celular da célula de origem vegetal. Adaptado de http://preuniversity.grkraj.org/html/1_CELL_STRUCTURE.htm

Tabela 1.2. – Aplicações do papel funcionalizado com diferentes tipos de np's.

Np's	Aplicação do papel funcionalizado	Referência
TiO ₂	Filtro de ar	(Iguchi, Ichiura, Kitaoka, & Tanaka, 2003)
Au	Biossensor colorimétrico	(Zhao, Ali, Aguirre, Brook, & Li, 2008)
TiO ₂ e Au	Auto-limpeza	(Uddin et al., 2008)
Ag	Embalagens alimentares antibacterianas	(Tankhiwale & Bajpai, 2009)
ZnO	Compressas anti-bacterianas	(Manna, Begum, Kumar, Misra, & Rana, 2013)

1.3 Actividade anti-bacteriana

O que seria de nós, humanos, sem agentes anti-bacterianos nos dias de hoje?

A descoberta destes agentes assim como o fabrico de outros vieram permitir um maior controlo no que respeita às infecções provocadas pelas bactérias, que muitas vezes levam a doenças, e até à morte.

Os agentes anti-bacterianos podem ter várias origens, bacteriana, fúngica, semi-sintética ou sintética, e têm a capacidade de inibir o crescimento bacteriano e/ou provocar a morte.

Apesar de existirem vários tipos, estes podem classificar-se em duas categorias; (Soares, 2013) agentes anti-bacterianos convencionais (orgânicos) e não convencionais (inorgânicos).

Entre os agentes convencionais tem-se o sabão, detergentes, etc e como não convencionais tem-se por exemplo a funcionalização do papel com agentes inorgânicos, como por exemplo os metais e óxidos de metais, já que estes têm demonstrado actividade anti-bacteriana (principalmente à nanoescala).

Uma possível aplicação deste material seria o fabrico de embalagens alimentares.

Em termos gerais, a actividade anti-bacteriana destes agentes pode ser descrita em termos de efeito bacteriostático e bactericida.

Os agentes considerados bacteriostáticos apenas inibem o crescimento ou multiplicação das bactérias; já os agentes bactericidas matam as bactérias.

Os principais modos de acção dos agentes anti-bacterianos estão resumidos na **Tabela 1.3.** ("10 • Antibacterial agents," n.d.)

Por fim, pode dizer-se que o modo de acção de um agente anti-bacteriano se baseia na estrutura da bactéria e função afectada pelo respectivo agente.

Tabela 1.3. Descrição da acção anti-bacteriana de agentes anti-bacterianos e respectivo mecanismo

Acção Anti-Bacteriana	Mecanismo
Inibição do Metabolismo Celular	Inibição de uma reacção que é catalisada por uma enzima que está presente na célula bacteriana.
Inibição da síntese da parede celular	Esta inibição leva à lise celular (ruptura) e à morte da célula. Nota: Uma vez que as células animais não são dotadas de parede celular, não são afectadas por tais agentes.
Interacções com a membrana plasmática	Esta interacção com a membrana plasmática vai afectar a permeabilidade da membrana, o que vai levar a consequências drásticas na célula, uma vez que vai afectar a permeabilidade selectiva da membrana.
Interrupção da síntese proteica	As enzimas que são essenciais para a sobrevivência da célula já não vão ser sintetizadas
Inibição da transcrição e replicação dos ácidos nucleicos	Ao inibir a(s) função (s) do ácido nucleico pára-se a divisão celular e/ou síntese de enzimas essenciais

1.3.1 Tipos de testes Anti-Bacterianos

Para avaliar o efeito de um dado agente anti-bacteriano é necessário recorrer a testes de susceptibilidade anti-bacteriana.

Dentro dos métodos disponíveis, a escolha de um deles deve basear-se na sua praticidade, flexibilidade, custo de automação, reproducibilidade e precisão. Contudo, estes testes baseiam-se em

duas técnicas, o e o método de Diluição em Agar (Determinação da concentração mínima inibitória) e método de Difusão em Agar (Kirby-Bauer e E-Test).

O método de diluição em agar consiste na determinação da concentração mínima inibitória (CMI), permitindo a melhor estimativa de susceptibilidade de uma bactéria em relação a um antibiótico. ("Global Salm-Surv," 2003)

A CMI corresponde à concentração mínima necessária para inibir o crescimento da bactéria a ser testada. Esta é geralmente determinada em situações de infecções graves (meningite), padrões de resistência invulgares, uso de novos antibióticos e organismos invulgares. (J. F. Acar; F. W. Goldstein, 1996)

É expressa normalmente em $\mu\text{l/ml}$ ou mg/L . No entanto, nem sempre apresenta um valor absoluto. O valor certo corresponde ao ponto entre a concentração mais baixa do teste que inibe o crescimento da bactéria e no próximo teste de concentração mais baixa. ("LABORATORY METHODOLOGIES FOR BACTERIAL ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING," 2012)

O método compreende as seguintes etapas:

- Selecção do meio de agar (normalmente é o Agar Muller-Hinton);
- Preparação das soluções de antibiótico;
- Preparação das placas e inóculo;
- Incubação das placas;
- Leitura dos resultados do teste.

Já o método de difusão em agar geralmente é feito por um dos dois métodos:

- Método de Kirby-Bauer (**Figura 1.4.**)
- Método de E-test (**Figura 1.5.**)

O primeiro refere-se à difusão de um agente anti-bacteriano, de específica concentração, que está contido num disco (geralmente com diâmetro de 6 mm). O disco é depois colocado no meio de cultura (geralmente o meio MHA – Agar *Muller-Hinton*), que é inoculado com a bactéria a testar.

A actividade anti-bacteriana vai ser determinada pela medição do halo de inibição formado (caso haja actividade anti-bacteriana), que é proporcional à susceptibilidade da bactéria face ao agente anti-bacteriano presente no disco.

É portanto, um método qualitativo.

No que diz respeito ao E-test, este teste tem como princípio o uso de uma tira plástica com o agente anti-bacteriano imobilizado num dos lados da tira.

Depois da incubação, a MIC é determinada pela intersecção da parte inferior da zona de inibição de crescimento em forma de elipse com a tira de teste por leitura directa (Jorgensen & Ferraro, 2009)

A escolha do meio, preparação e inóculo, incubação das placas e temperatura de incubação são as mesmas que as usadas para o método de Kirby-Bauer (J. F. Acar; F. W. Goldstein, 1996). A vantagem que apresenta para a metodologia anterior é o facto de ser possível determinar a concentração mínima inibitória.



Figura 1.4. Método de difusão em agar – Kirby-Bauer (<http://www.apcontinuada.com/es/el-antibiograma-interpretacion-del-antibiograma/articulo/80000504/>)

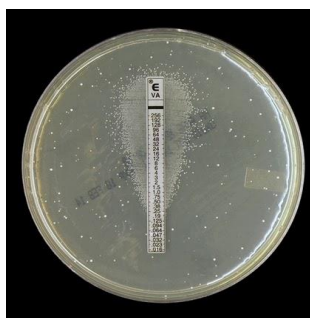


Figura 1.5. Método de difusão em agar – E-test (<http://www.apcontinuada.com/es/el-antibiograma-interpretacion-del-antibiograma/articulo/80000504/>)

1.3.2. Mecanismos de Actuação das Nanopartículas

Para se perceber de que forma as bactérias reagem às nanopartículas, (mais especificamente às nanopartículas de metais e óxidos de metais) torna-se necessário, perceber a estrutura da bactéria a ser testada.

Neste sentido, as bactérias podem ser classificadas em dois grandes grupos: as Gram-positivas e Gram-negativas.

Em relação às primeiras, estas contêm uma parede celular (**Figura 1.6. a)**) que contém uma espessa camada (20 – 50 nm) de peptidoglicano, que está ligado aos ácidos teicóicos que são únicos para a parede celular deste tipo de bactérias.

Já nas Gram-negativas a estrutura é mais complexa (**Figura 1.6.b)**) pois a a parede celular compreende uma fina camada de peptidoglicano e contém uma membrana exterior, que abrange a superfície da membrana. A membrana destas bactérias confere resistência aos compostos hidrofóbicos e contém um único componente, os lipopolissacarídeos, que aumentam a carga negativa da membrana celular e são essenciais para a integridade estrutural e viabilidade da bactéria.

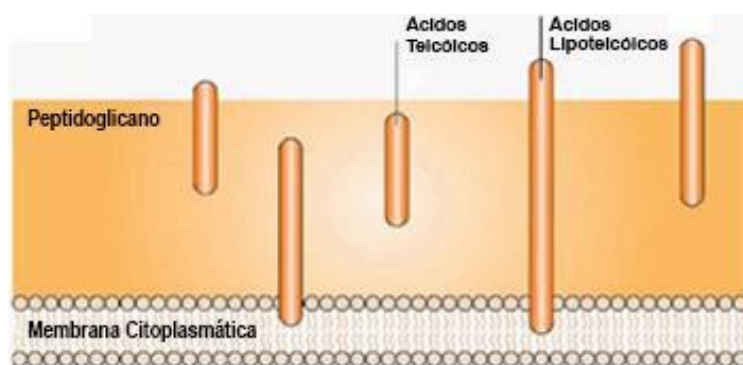


Figura 1.6.a) Bactéria Gram-positiva (Gram +) (Hajipour et al., 2012)

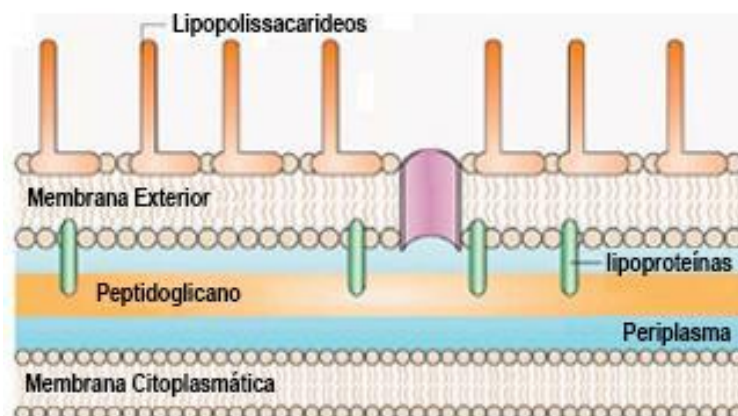


Figura 1.6.b) Bactéria Gram-negativa (Gram -) (Hajipour et al., 2012)

Deste modo, o agente anti-bacteriano vai agir em conformidade com a estrutura bacteriana. (Hajipour et al., 2012) (Koga, Kitaoka, & Wariishi, 2009) Mas não só, de acordo com a literatura, não é só a estrutura da bactéria, ou factores somente relacionados com esta que vão influenciar a eficácia e portanto, o mecanismo de actuação do agente anti-bacteriano. Factores como o tamanho (Guzmán,

Dille, & Godet, 2009)(L. Zhang et al., 2007) , forma (Uskokovi, 2013)(Mayekar, Dhar, & Radha, 2014) concentração (Pasquet et al., 2014), entre outros são cruciais.

Para além destes factores, por vezes quando se juntam dois tipos de np's ocorrem efeitos de sinergismo, havendo uma maior actividade anti-bacteriana do que quando as np's se encontram "isoladas". (Motshekga, Ray, Onyango, & Momba, 2013)

Apesar de os mecanismos de actuação das np's não estarem totalmente esclarecidos, de seguida descrevem-se os principais.

A ligação das np's á superfície das membranas celulares, perturbando a permeabilidade e as funções respiratórias dos microrganismos, assim como a libertação de iões metálicos, que de certo modo acaba por explicar o mecanismo das np's, já que o mecanismo entre estes é muito similar na medida em que a transferência de iões vai contribuir para a formação de espécies reactivas de oxigénio - subprodutos naturais do metabolismo respiratório dos organismos,(Ghule, Ghule, Chen, & Ling, 2006) que quando produzidas em excesso podem induzir o *stress* oxidativo e consequentemente a produção de radicais livres que podem atacar a membrana célula levando á sua ruptura ou causar danos no ADN.

Este também pode ser causado quando as np's penetram no interior da célula bacteriana, interagindo com os componentes das bactérias, que são constituídos por enxofre e fósforo. Como consequência, os componentes celulares ficam danificados (proteínas, lípidos e ADN). (Guzmán et al., 2009)(Pati et al., 2014) (Ghule et al., 2006))(Hajipour et al., 2012)

A **Figura 1.7.** ilustra os mecanismos aqui descritos.

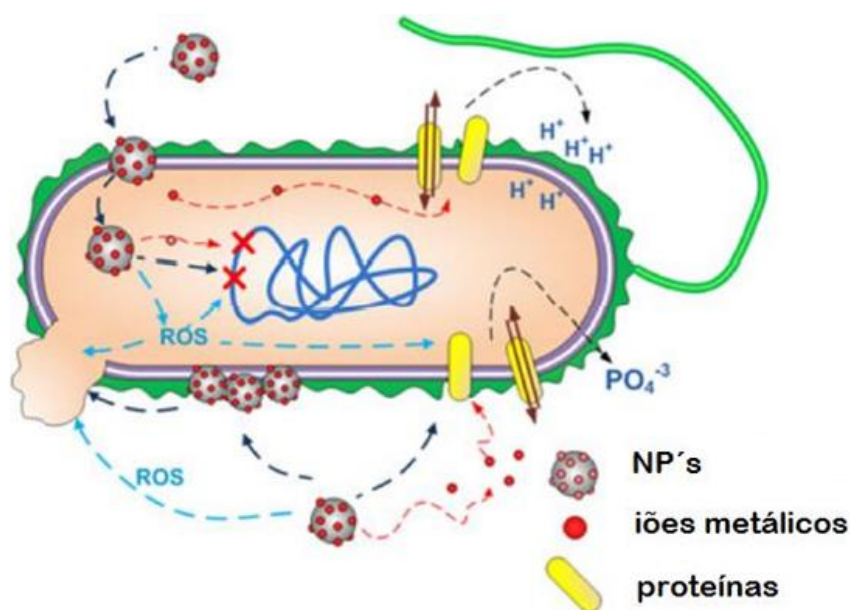


Figura 1.7. Esquematisação das possíveis interacções das np's com as células bacterianas : As np's podem : libertar iões metálicos e originar ERO (espécies reactivas de oxigénio), interagir com as proteínas da membrana afectando as suas funções, acumular-se na membrana celular afectando a sua permeabilidade e por fim entrar na célula, o que pode originar ERO, libertar iões e afectar o ADN. Note-se que as espécies RO's e iões também podem afectar o ADN, a membrana e as proteínas desta. (Guzmán et al., 2009)

2. Materiais e Métodos

O presente trabalho experimental teve como finalidade a criação de um papel anti-bacteriano, através da sua funcionalização com nanopartículas, direccionando-se para uma aplicação específica, a desinfecção de água.

Neste sentido, a actividade experimental irá incidir na síntese e consequente incorporação das nanopartículas em papel de filtro de café, segundo diferentes metodologias, e a possível actividade anti-bacteriana será avaliada por meio de testes de sensibilidade aos antibióticos.

Por fim, e de modo a validar o trabalho experimental para a aplicação que se propõe, irão-se seleccionar os papéis com a melhor actividade anti-bacteriana para fazer testes de filtração de membrana com amostras de água contaminada.

A **Figura 2.1.** esquematiza de uma forma resumida todo o processo experimental.

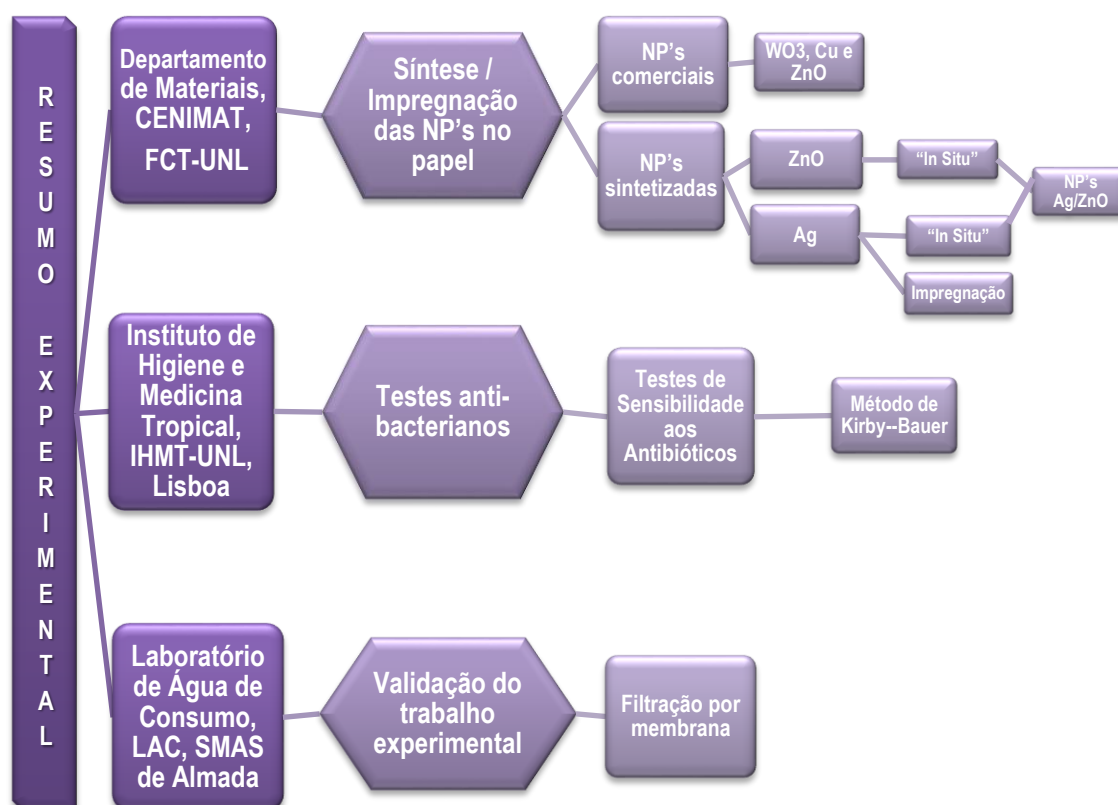


Figura 2.1. Esquematização do procedimento experimental.

2.1 Síntese das nanopartículas

A síntese das np's consistiu em realizar a síntese de nanopartículas no papel assim como toda a caracterização do mesmo recorrendo às várias técnicas disponíveis no departamento.

Para avaliar a eficácia do efeito anti-bacteriano no papel de filtro recorreu-se ao método de Testes de Sensibilidade de Antibióticos, segundo a técnica de Kirby-Bauer, e por esse motivo neste estudo é que se utilizaram dois tipos de papel.

Assim sendo, usou-se o papel de filtro de café da marca HOME 7, nº 4, que sendo um material para filtrar café está aprovado para produtos alimentares, o que só por si é uma vantagem atendendo ao objectivo do trabalho.

Este é distribuído pela cadeia Pingo Doce Distribuição Alimentar, S.A, e o outro tipo de papel consistia nuns discos comerciais, da marca ROTH, Rotilabo® - Test Flakes, cotton linter, de 6 mm de diâmetro, medida essa que está padronizada para este tipo de testes (J. F. Acar; F. W. Goldstein, 1996). Estes discos são muito utilizados neste tipo de testes, que no fundo servem como um controlo, uma comparação, servindo portanto, como uma validação do método.

Apesar destes discos serem adequados para estes testes, o papel de filtro de café “não o é”, e portanto houve a necessidade de cortar o papel (através de um laser de CO₂ de corte) em pequenos círculos de diâmetro 6 mm, de forma a realizar os testes em condições similares – não foram as mesmas condições uma vez que a espessura do papel era diferente da espessura dos discos.

No processo de incorporação sintetizaram-se nanopartículas de prata, óxido de zinco e np's de prata e óxido de zinco, assim como também se efectuaram testes com nanopartículas comerciais, de modo a permitir uma comparação em termos de tamanhos, morfologia e eficácia anti-bacteriana das nanopartículas em estudo.

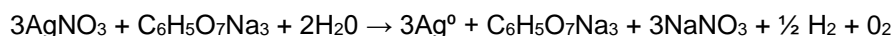
2.1.1. Síntese de nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata foram sintetizadas por meio de uma reacção química, a redução. Foram efectuadas dois tipos de sínteses, com base no mesmo princípio, variando, a metodologia de síntese o tipo de redutor, isto é, o citrato de sódio (Soares, 2013) e o borohidreto de sódio (Solomon, Bahadory, Jeyarajasingam, Rutkowsky, & Boritz, 2007) e (Dankovich & Gray, 2011)

Assim, partindo-se de um sal de prata, como por exemplo o AgNO₃, foi possível obter as np's de prata através da acção do agente redutor.

⇒ Síntese de nanopartículas de prata via impregnação

Nesta metodologia usam-se os dois tipos de redutores, o citrato e sódio e o borohidreto de sódio. A síntese com o redutor citrato de sódio ocorre de acordo com a reacção:



e requer a preparação de duas soluções, uma de nitrato de prata de concentração 10 mM e uma solução de citrato de sódio 300 mM. O procedimento, consiste em colocar 50 mL de solução de nitrato de prata em aquecimento com refluxo (**Figura 2.2**) e sob agitação constante a uma velocidade de 1100 rpm, esperando que a solução entre em ebulição e de seguida adicionar-se, gota a gota, 5 mL da solução de citrato de sódio. Após se observar uma mudança de cor da solução para uma tonalidade amarelada, deixou-se reagir por alguns minutos e retirou-se a solução do aquecimento, mantendo-se a agitação a frio. Depois impregnou-se o papel de filtro de café e os discos comerciais em 20 mL de solução durante 10, 20, e 30 minutos. Repetiu-se a síntese mas desta vez com uma concentração de nitrato de prata de 1 mM, para uma concentração de agente redutor de 30 mM. (Soares, 2013). Na síntese com o borohidreto de sódio começou-se por preparar duas soluções, a de nitrato de prata, com uma concentração de 1 mM, e a de borohidreto de sódio, com o dobro da concentração. Colocaram-se 30 mL da solução de NaBH₄ num erlenmeyer, num banho de gelo, numa placa em agitação, durante 20 min, a 1400 rpm. De seguida, adicionaram-se 2 mL da solução de AgNO₃, gota-a-gota, em que mistura reaccional ficou amarelada, o que indicou que ocorreu a formação de npAg's. De seguida, parou-se com a agitação. Repetiu-se o procedimento para 10 mM de AgNO₃ para 20 mM de NaBH₄. À semelhança da síntese anterior, impregnaram-se o papel de filtro e os discos comerciais em 20 mL da solução durante 10, 20 e 30 minutos.

Esta síntese ocorre de acordo com a reacção:

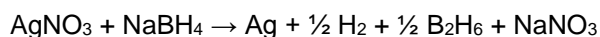




Figura 2.2. Ilustração da montagem experimental para a síntese de np'sAg via citrato de sódio.

⇒ Síntese de nanopartículas de prata *"in situ"*

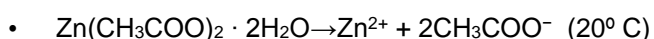
Nesta síntese os papéis (e os discos comerciais) são colocados em contacto directo com as soluções durante a síntese.

Relativamente à síntese com o citrato de sódio, a síntese é igual á anteriormente descrita com a diferença de que nesta o papel de filtro de café e os discos comerciais são colocados durante a síntese. Usando o agente redutor borohidreto de sódio, o procedimento é diferente. (Dankovich & Gray, 2011). Prepararam-se duas soluções, a de nitrato de prata (AgNO_3) e de agente redutor, o borohidreto de sódio, NaBH_4 , na proporção de 1:6, em que a $[\text{AgNO}_3] = 10\text{mM}$ e de $[\text{NaBH}_4] = 60\text{ mM}$. De seguida, colocaram-se 20 mL da solução de AgNO_3 numa tina, mergulhando-se o papel de filtro de café e os discos comerciais, durante 30 minutos. De seguida, procedeu-se à lavagem dos papéis com etanol, com a finalidade de remover o excesso de AgNO_3 que não foi absorvido pelos papéis. Para formar as npAg's os papéis foram então colocados numa tina com 20 mL da solução de NaBH_4 durante 15 minutos. Por fim, mergulhou-se o papel durante 60 minutos em água desionizada, e deixou-se secar à temperatura ambiente. Repetiu-se o procedimento para 1 mM de AgNO_3 para 6 mM de NaBH_4 .

2.1.2. Síntese de nanopartículas de óxido de zinco *"in situ"*

Esta síntese foi realizada de acordo com os autores (Hu et al., 2010).

Preparou-se uma solução de 10 mM de acetato de zinco di-hidratado em acetona, dissolvendo-se de seguida, de acordo com a reacção:



Transferiu-se a mistura reaccional para uma tina já contendo o papel de filtro de café, deixando-a num banho de óleo a 90°C , dando-se a evaporação da acetona e hidrólise dos sais de zinco de acordo com a reacção:



Por fim, após a acetona evaporar retirou-se o papel. Atendendo às proporções, sintetizaram-se np's de ZnO partindo de concentrações de acetato de zinco di-hidratado de 1, 5, 50 e 100 mM.

2.1.3. Síntese de nanopartículas de prata e óxido de zinco

Efectuou-se o procedimento experimental da síntese de np's de prata com a metodologia "in situ", usando o citrato de sódio, e após o papel estar seco impregnou-se o papel na solução de acetato de zinco/acetona, seguindo o procedimento experimental descrito na secção anterior (2.1.2)

2.2. Impregnação com nanopartículas

2.2.1. Nanopartículas comerciais

As nanopartículas comerciais testadas foram de ZnO (em pó e suspensão), de Cobre e de Tungsténio. Para o caso das np's em pó, prepararam-se soluções de 100 mM e de seguida colocaram-se os papéis impregnados em 20 mL numa tina sob agitação de ultrassons durante 30 min.

Retiraram-se os papéis (de filtro e discos comerciais) e deixaram-se secar à temperatura ambiente. Relativamente á suspensão comercial de ZnO, retiraram-se 10 mL da suspensão e adicionaram-se outros 10 mL de água desionizada e procedeu-se da mesma forma.

2.3 Realização de Testes Anti-Bacterianos

Estes testes foram realizados com a colaboração do Instituto de Higiêne e Medicina Tropical sob orientação da Professora Isabel Coutinho e da Doutora Sofia Costa.

Após ter os papéis impregnados com as diferentes nanopartículas, com várias concentrações e por métodos distintos, fizeram-se testes de modo a avaliar o efeito anti-bacteriano do papel.

Como foi acima mencionado, usaram-se dois papéis diferentes, o papel de filtro de café, e os discos comerciais. No entanto, no caso destes últimos só se fizeram testes numa fase inicial.

Estes testes são muito utilizados na área da microbiologia e indústria farmacêutica, quando se quer avaliar a eficácia de um antibiótico face aos microrganismos: Testes de Sensibilidade aos Antibióticos. Como foi acima mencionado, existem vários métodos de fazer estes testes, e neste caso recorreu-se ao método de Kirby-Bauer.

2.3.1. Materiais e Métodos

As bactérias utilizadas foram a *E.coli* ATCC25922 e *S. aureus* ATCC25923 (**Figura 2.3**). O motivo desta selecção prendeu-se ao facto destes tipos de estirpes serem das mais relevantes e problemáticas neste tipo de aplicações anti-bacterianas.

Foram realizados controlos negativos, de modo a eliminar quaisquer interferências por parte dos reagentes. No caso das sínteses de np's prata substituiu-se o nitrato de prata por nitrato de potássio, e na síntese de np's de óxido de zinco substituiu-se o acetato de zinco por acetato de cálcio.

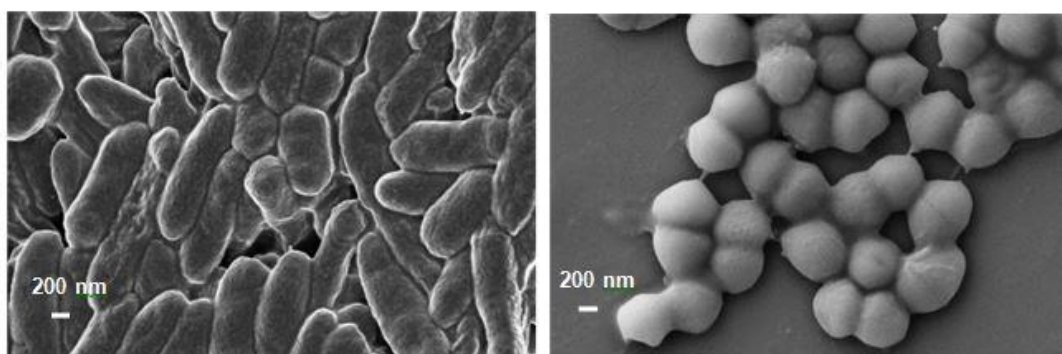





Figura 2.3. Imagens SEM de *E.coli* (à esq.) e de *E. faecalis* obtidas através de microscópia electrónica de varrimento existente no CENIMAT/I3N

2.3.2 Procedimento Experimental

Os testes foram realizados pelo método de Kirby-Bauer. Este pode dividir-se em três passos :

-  **a) Preparação do meio Agar Muller-Hinton (MHA)**
-  **b) Preparação da suspensão bacteriana**
-  **c) Inoculação das placas e colocação dos discos**

2.3.2.a) Preparação do meio Agar Müller -Hinton (MHA)

Neste primeiro passo dissolveu-se uma quantidade do reagente MHA numa quantidade de água esterilizada, levando-se depois o frasco à autoclave. Depois, deixou-se arrefecer e colocou-se 20 mL em cada placa, deixando o meio MHA solidificar. A tonalidade deste meio quando está quente é amarelada e quando está sólida muda para uma cor esbranquiçada.

Por fim, colocam-se as placas na estufa, a 37° C, durante cerca de meia hora, para secarem.

2.3.2.b) Preparação da suspensão bacteriana

A partir de uma cultura pura dos microorganismos em estudo, retirou-se cerca de 4 colónias, bem isoladas, suspendendo-se a ansa em 8 mL de soro estéril. De seguida, usou-se o vortéx para homogeneizar.

Uma vez que ao retirar algumas colónias das culturas não se tem a noção da concentração bacteriana que se vai colocar no soro estéril, existem metodologias através das quais podemos “resolver” esse problema.

A escala de McFarland é um deles.

Esta consiste numa série de padrões de turbidez (**Figura 2.4.**), que são usados para estimar o número aproximado de bactérias numa suspensão líquida por comparação visual com a turbidez de um dos destes.

Estes padrões são preparados com a mistura de dois reagentes, o cloreto de bário e o ácido sulfúrico, de forma a obter um precipitado, o sulfato de bário. (Control, n.d.)

Assim, com o ajuste das proporções destes reagentes, vão-se obtendo vários controlos (padrões) com progressivos estados de turbidez, podendo estes assim, então, representar as várias concentrações de bactérias.

Este método apresenta como vantagem o facto de não ser necessário tempo de incubação ou equipamento para estimar a concentração bacteriana; No entanto, oferece alguma imprecisão pois está subjacente alguma subjectividade na interpretação da turbidez. (Sutton, 2011)



Figura 2.4. Padrões de Mcfarland

2.3.2.c) Inoculação das placas e colocação dos discos

Por fim, a distribuição do inóculo nas placas foi feita à chama, ou seja, num ambiente estéril, e com recurso a uma zaragatoa, que se mergulhou em cada tubo de ensaio contendo a suspensão – tendo o cuidado de se escorrer o excesso de líquido contra as paredes do tubo, e distribuiu-se, de forma

uniforme sob a placa, evitando-se exercer muita pressão para não furar o meio nutritivo, rodando 90 ° C de cada vez.

Deixou-se repousar o inóculo durante alguns minutos, e com uma pinça estéril começaram-se a colocar os discos (papeis com NP e controlos), submetendo a pinça à chama sempre que se mudava de amostra.

Note-se que os discos foram colocados a uma distância relativa dos bordos da placa e distanciados entre si – a divisão prévia efectuada na placa com um marcador “ajudou” a que se conseguisse manter os discos equidistantes, de modo a evitar a sobreposição das zonas de inibição.

Finalmente, inverteram-se as placas e incubaram-se a 37 ° C, a temperatura óptima de crescimento destas estirpes.

Os resultados foram então medidos/registados após 18 horas de incubação, por medição das zonas de inibição formadas- halos de inibição, com o auxílio de uma régua.

2.4. Filtração por Membrana

Após a leitura dos resultados dos testes bacterianos, seleccionaram-se os papéis com nanopartículas que evidenciaram um maior halo de inibição, fazendo-se novas sínteses, mas desta vez, no papel de filtro com um diâmetro de 47 mm, sendo esta a medida das membranas padronizadas para esta técnica. O procedimento experimental consiste na realização da filtração de amostras de água contaminada através de uma membrana.

2.4.1. Materiais e Procedimento Experimental

O procedimento envolve a preparação de meios selectivos, o meio *Membrane Lauryl Sulphate Agar* e o meio *Slanetz and Bartley* (**Figura 2.5.**) para as bactérias indicadoras *E.coli* e *E.faecalis* respectivamente.

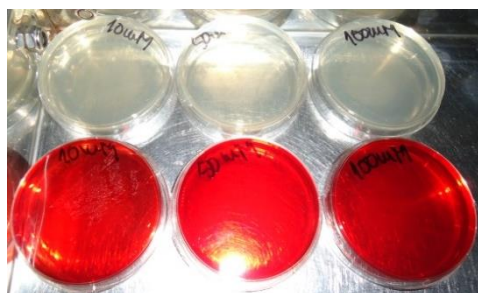


Figura 2.5. Meios selectivos para crescimento de *E.coli* (meio vermelho) e *E.faecalis* (amarelo)

Com os meios preparados, esterelizam-se os papéis funcionalizados com as np's, com luz ultravioleta durante trinta minutos.

De seguida, colocaram-se os papéis (ou membranas) nos dispositivos de filtração (**Figura 2.6.**), fazendo-se passar 100 mL de água contaminada (ou de uma amostra que simula a água contaminada), anotando o tempo que a amostra demorou a escoar.

De seguida, recorre-se à técnica da membrana filtrante, em que inicialmente se vai fazer passar um certo volume pela membrana nanométrica, da marca millipore (**Figura 2.7**) cujos poros têm o tamanho de 0,45 µm, conseguindo, portanto, reter as bactérias. Esta membrana vai ser a membrana de referência, ou seja, a *baseline*, isto é, como os poros da membrana retêm as bactérias, ao fazer-se passar a amostra contaminada sabe-se a quantidade de UFC que estavam na amostra (após colocar a membrana no meio e passando o tempo de incubação).

Assim, será com esta membrana que se irão comparar os resultados decorrentes das filtrações com as membranas contendo as np's.

Após fazer a *baseline*, faz-se então passar o filtrado (amostra/água contaminada resultante da passagem pela membrana contendo as np's) pelas membranas padronizadas para esta técnica

(nanométricas/millipore). Esta filtração é feita numa rampa de filtração, numa câmara de fluxo laminar, com recurso a vácuo, sendo portanto, uma filtração rápida (**Figura 2.8**)



Figura 2.6. dispositivos usados na filtração da amostra contaminada com as membranas contendo as np's.



Figura 2.7. Membrana nanométrica da marca millipore.

Após a filtração, retiram-se as membranas e colocam-se nos respectivos meios (uma membrana será para *E.coli* e outra para *E.faecalis*).

Por fim, colocam-se os meios na estufa, e faz-se a contagem das bactérias após 24 horas p *E.coli* e 48 h para *E.faecalis*.

De salientar que foram feitos controlos negativos, isto é, fez-se passar a água contaminada por um papel de filtro de café sem np's (duas vezes) colocando-o no meio respectivo, neste caso, dois meios diferentes, um para *E.coli* e outra para *E.faecalis* – Isto para eliminar interferências do papel caso haja actividade anti-bacteriana.

Parte do volume dos filtrados vai ser colocado em pequenos frascos, em que se adiciona 1 mL de ácido nítrico concentrado por cada 50 mL de filtrado e posteriormente se conservam no frigorífico (este procedimento vai conservar a amostra).

Por fim, passado o tempo de incubação para as duas estirpes faz-se a contagem de bactérias comparando o número destas com as presentes na *baseline*.



Figura 2.8. Câmara de fluxo laminar com evidência para a rampa de filtração.

Por fim, de forma a avaliar a quantidade de metal presente nos filtrados, recorreu-se à técnica de Espectroscopia de Absorção atómica.

3. Técnicas de Caracterização

A caracterização do papel funcionalizado com as diferentes np's foi feita com o recurso a várias técnicas, e nesse sentido a caracterização foi realizada em termos morfológicos, ópticos, estruturais e térmicos.

A caracterização morfológica foi realizada através da microscopia electrónica de varrimento, a qual permitiu avaliar a presença das np's, bem como o estado de dispersão e/ou agregação destas nas fibras celulósicas, permitindo a exploração da nanoescala.

Com as técnicas de caracterização estrutural e óptica, identificar os compostos presentes, assim como quantificar as propriedades estruturais, e explorar propriedades ópticas decorrentes da funcionalização do papel de filtro de café com as nanopartículas.

Por fim, com a análise térmica, e em particular através da termogravimetria, determinar a quantidade de np's que fica no papel (massa residual), sendo uma caracterização importante nomeadamente para distinguir métodos de incorporação das nanopartículas no papel.

3.1.Caracterização Morfológica.

3.1.1. Microscopia Electrónica de Varrimento (*Scanning Electron Microscopy – SEM*)

A microscopia electrónica permite, através da interação entre um feixe de electrões altamente energético e uma dada amostra, recolher informação morfológica sobre a mesma, mais especificamente, imagens de alta resolução da superfície da amostra à escala nanométrica.

A técnica consiste no varrimento pelo feixe de electrões na superfície da amostra em observação. Uma vez que as amostras em estudo não são condutoras, foram sujeitas a um processo de metalização, obter-se uma fina camada de metal, neste caso ouro, à superfície de modo a melhorar a condutividade térmica e eléctrica das mesmas. Esta camada apresenta uma espessura necessária à boa produção de iões secundários cuja detecção permite a formação da imagem. ("CHAPTER 3. DEVICE FABRICATION AND CHARACTERIZATION TECHNIQUES," n.d.)

Esta técnica apresenta como vantagens a obtenção de imagens altamente ampliadas (desde 10 - 1000000 vezes) da superfície do material devido ao feixe de electrões cujo comprimento de onda ($\lambda = 0,012 \text{ nm}$) é muito inferior ao dos fotões de luz visível ($400 \text{ nm} < \lambda_{\text{visível}} < 700 \text{ nm}$). (Soares, 2013)

Utilizou-se o equipamento Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB disponível no CENIMAT/I3N (**Figura 3.1**). Na obtenção das imagens foi utilizada uma tensão de aceleração de 2 kV, uma abertura de diafragma de 30 μm e uma distância de trabalho entre a amostra e a coluna de SEM de aproximadamente 5,3 mm.

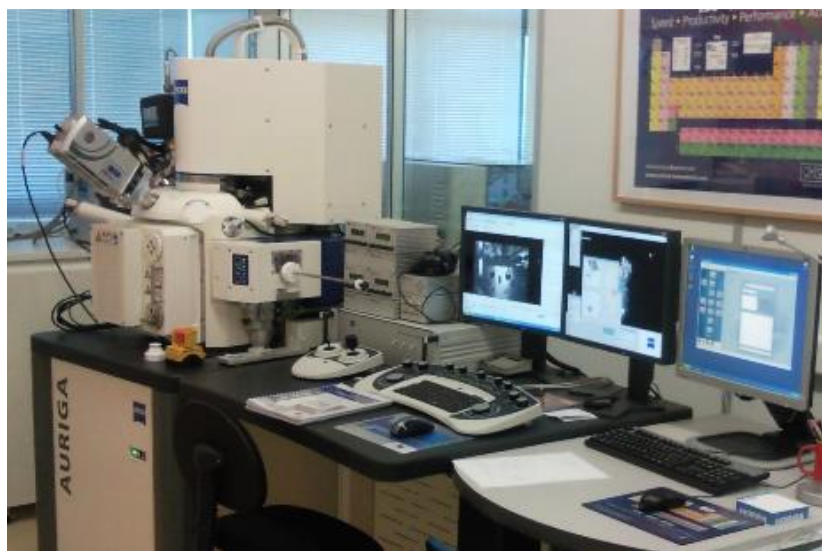


Figura 3.1. Equipamento Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB disponível no CENIMAT/I3N

3.2. Caracterização Óptica e Estrutural

3.2.1. Espectroscopia Dispersiva de raios-X (*Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy*)

Com SEM, para além de informação topográfica, é possível analisar a composição química da superfície do material, através da Espectroscopia Dispersiva de Raios-X, já que o detetor EDS pode ser utilizado para detecção elementar no SEM. Os detetores do SEM produzem um sinal proporcional ao número de fótons raios-X detetados na área onde incide o feixe de electrões, em que com EDS o sinal é exibido como um espectro de intensidade (número de fótons registados) em função da energia dos raios-X (**Figura 3.2**)

Os detetores podem ser ajustados de modo a passarem apenas uma gama de pulsos correspondentes ao pico de raios-X característico de um determinado elemento. O resultado permite produzir uma imagem elementar ou um mapa de raios-X da amostra, no entanto, esta técnica está limitada à identificação de elementos de número atómico superior a $Z = 5$ (boro). (Costa, 2012)

Para a obtenção dos espectros EDS dos materiais estudados utilizou-se um detetor Oxford INCA xact com uma tensão de aceleração de 15,00 kV e abertura de diafragma de 60,00 μm de modo a maximizar o sinal de raios-X emitidos pelas amostras.

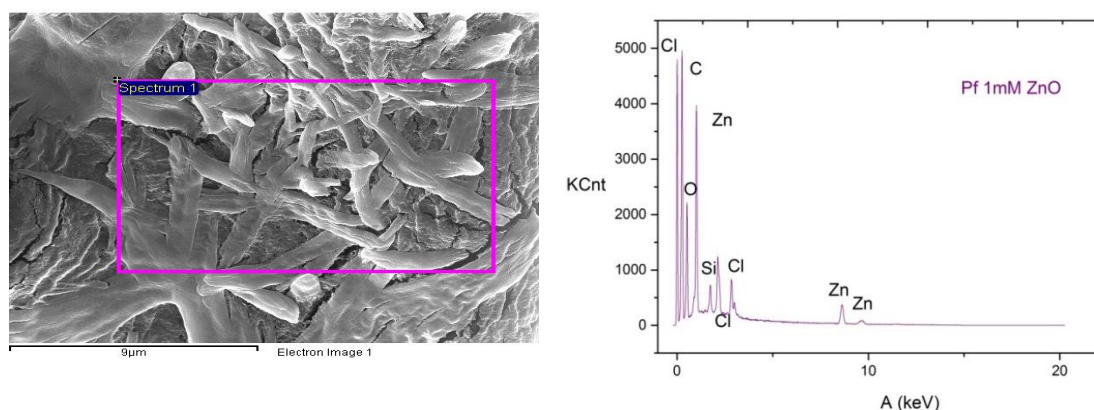


Figura 3.2. Imagem SEM de uma amostra de papel e respectivo espectro dispersivo de raios-X.

3.2.2. Espectroscopia de absorção Uv-Visível (*UV-Visible Spectroscopy*)

A espectroscopia de absorção de UV/Visível é uma técnica usada para quantificar a luz que é absorvida e dispersa por uma amostra. A amostra é colocada entre a fonte luminosa e o detetor, sendo a intensidade do feixe de luz medida antes e depois de passar pela amostra. O espectro resultante da soma da luz absorvida e da luz dispersa pela amostra e os seus dados são tipicamente representados numa curva que varia em função do comprimento de onda. Para garantir que as características espectrais da fase dispersa não influenciam o espectro da amostra, é estabelecida uma linha de base, que corresponde ao espectro do solvente.

As nanopartículas têm propriedades ópticas dependentes do seu tamanho, forma, concentração, estado de aglomeração e índice de refração junto da sua superfície, o que faz com que a espectroscopia UV/VIS seja uma ferramenta valorizada para a identificação, caracterização e estudo deste tipo de materiais. Nanopartículas metálicas, como as de prata, interagem fortemente a comprimentos de onda específicos. As lâmpadas usadas neste tipo de equipamento são tipicamente de Deutério e Tungsténio e os espectros são normalmente obtidos a partir de células de 1 mL.

O espectrofotómetro usado e disponível no CENIMAT/I3N foi o PerkinElmer UV/Vis/Nir spectrometer Lambda 950 (**Figura 3.3**)



Figura 3.3. Espectrofotómetro PerkinElmer UV/Vis/NIR Lambda 95 disponível no CENIMAT/I3N

3.2.3. Difracção de raios-X (*X-Rays Diffraction, XRD*)

A difracção de raios-X (DRX) é uma técnica de caracterização não destrutiva que permite a identificação de fases cristalinas bem como a quantificação de algumas propriedades estruturais (por exemplo, tamanho de grão, composição de fase, orientação preferencial e defeitos na rede cristalina), com base na interacção entre um feixe de raios-X incidente e os electrões dos átomos do material que constitui a amostra.

A técnica baseia-se na incidência de um feixe monocromático de raios-X na amostra e na detecção dos fotões dos feixes difractados. Deste modo, quando um feixe de raios-X atinge certos planos cristalográficos em ângulos específicos, as ondas dispersas interferem construtivamente. Logo, num material onde os átomos estejam orientados periodicamente no espaço (característica das estruturas cristalinas), o fenómeno da difracção de raios-X (interferência construtiva) ocorre na situação em que a radiação que incide segundo um determinado ângulo em relação à superfície da amostra (ângulo de Bragg – θ), origina interferências construtivas que acontecem para múltiplos (n) do comprimento de onda (λ), relacionados com o espaçamento entre planos atómicos (d_{hkl}).

Na **figura 3.4. á esquerda** é ilustra-se o fenómeno da difracção de raios-X, o qual é descrito pela lei de Bragg, que se traduz na equação :

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta$$

O feixe difractado é normalmente expresso através de picos que se destacam da linha de base e são registados num espectro de intensidade em função do ângulo de difracção 2θ , constituindo o padrão difractométrico ou difractograma, em que cada composto (caso seja cristalino) irá apresentar um padrão difractométrico característico, permitindo a sua identificação através das posições angulares e intensidades dos picos difractados.

Na **Figura 3.4 á direita** exemplificam-se dois exemplos de difractogramas de DRX característicos de materiais que apresentam uma estrutura amorfa e cristalina. No primeiro caso, os raios-X são dispersos em todas as direcções ao incidirem numa substância de estrutura completamente aleatória, sendo os difractogramas típicos de substâncias amorfas geralmente constituídos por bandas largas sem a presença de picos.

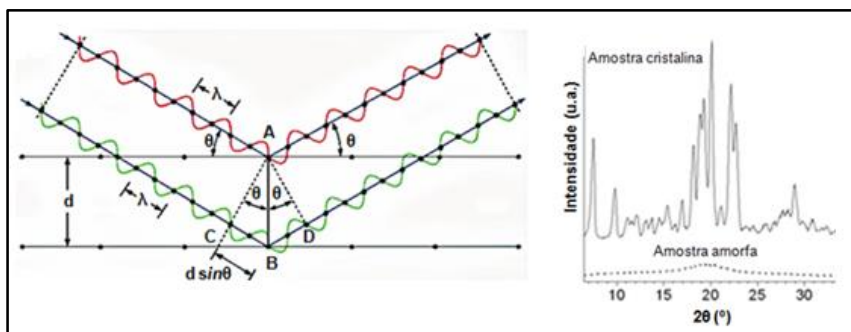


Figura 0.4. a) Representação esquemática do princípio de funcionamento do DRX (lei de Bragg) e **b)** Difractogramas típicos de materiais cristalinos e amorfos (adaptado de ("Cunha_2013 vs," n.d.)

As análises de DRX foram realizadas no aparelho *PANalytical X'Pert PRO*, ilustrado na **Figura 3.5.** e o padrão de difracção foi adquirido para ângulos 2θ entre 10° e 90° .



Figura 3.5. Equipamento de difracção de raios-X X'Pert PRO da PANalytical, situado no CENIMAT/I3N

3.3. Caracterização Térmica

3.3.1. Termogravimetria (*Thermal Analysis, TA*)

A Termogravimetria é uma técnica termoanalítica que estuda a alteração da massa de uma amostra em função da temperatura (modo de varrimento ou não isotérmico) ou do tempo (modo isotérmico). As curvas termogravimétricas são normalmente representadas como a variação de massa, expressa em percentagem, em função da temperatura ou tempo e são influenciadas por diversos factores, instrumentais e relativos à própria amostra.

De entre os factores instrumentais, tem-se a razão de aquecimento do forno, bem como a sua atmosfera, geometria do suporte de amostras e do forno. (Bioidênticos & Estradiol, 2013)

Os factores relacionados com a amostra compreendem o tamanho das partículas, quantidade de amostra, solubilidade de gases libertados na amostra, calor da reacção, compactação da amostra, natureza e condutividade térmica da amostra.

3.3.2. Calorimetria Diferencial de Varrimento (*Diferencial Scanning Calorimetry, DSC*)

A Calorimetria Diferencial de Varrimento é uma ferramenta analítica que permite caracterizar fisicamente as propriedades de vários materiais, como por exemplo polímeros, nomeadamente a celulose.

Assim, através desta técnica podem-se acompanhar os efeitos de calor associados com as alterações físico-químicas da amostra, tais como transições de fase (fusão, enulção, congelação), reacções de desidratação, dissociação, composição e oxidação-redução capazes de causar variações de calor.

Geralmente, transições de fase, desidratações, reduções e certas reacções de decomposição originam picos endotérmicos; já picos exotérmicos estão associados a cristalizações e oxidações. (Bioidênticos & Estradiol, 2013)

Basicamente, esta técnica vai aliar as curvas de aquecimento e arrefecimento com os dados quantitativos da calorimetria.

Muitos instrumentos de Análise Térmica oferecem a capacidade de simultaneamente realizar ensaios de análise TG e DSC, o que permite que as condições experimentais e da amostra sejam idênticas, e levando assim à rápida obtenção de dados que podem ser comparados diretamente. (Costa, 2012)

A análise térmica dos substratos de celulose foi efetuada em atmosfera de ar, em cadinho de Alumínio aberto, no intervalo entre 20°C e 550°C com uma taxa de aquecimento de 10 K/min .

O equipamento usado para estas duas técnicas foi o Analisador Térmico STA 449 F3 Jupiter (**Figura 3.6**), um equipamento flexível, robusto e relativamente simples de usar para determinar os efeitos calóricos (temperaturas de transformação e entalpia) e variação de massa simultaneamente.



Figura 3.6. Analisador Térmico STA 449 F3 Jupiter disponível no CENIMAT/I3N.

3.4. Técnicas de Análise Elementar

3.4.1. Espectroscopia de Absorção Atômica de Chama (*Flame Atomic Absorption Spectroscopy, FAAS*)

A Espectroscopia de Absorção Atômica tem três variantes consoante o meio de atomização de amostra, que pode ser efectuada em Forno de Grafite (*GAAS – Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy*), por Geração de Hidretos (*HGAAS - Hydride Generation Atomic Absorption Spectroscopy*) ou de Chama (*FAAS - Flame Atomic Absorption Spectroscopy*). Esta última variante foi a técnica usada, atomizando-se a amostra através da chama. Esta é uma técnica de execução rápida, fácil e com uma sensibilidade extremamente alta. A amostra é então atomizada na chama, através da qual passa radiação com comprimento de onda adequado a cada elemento a analisar (fonte - lâmpada de cátodo oco). A quantidade de radiação absorvida é uma medida quantitativa da concentração do elemento a ser analisado. A amostra é então lançada na chama que atinge temperaturas que variam entre 2100-2300 °C. Durante a combustão, os átomos da amostra são reduzidos ao estado atômico. Um feixe de radiação é emitido por uma lâmpada cujo cátodo é feito do elemento a ser determinado. A radiação após atravessar a chama passa por um monocromador e atinge o detector. Os átomos livres no estado fundamental absorvem radiação a comprimentos de onda característicos de cada elemento. A redução de energia da radiação no comprimento de onda característico do analítico é uma medida da quantidade desse elemento na amostra. As amostras são analisadas em solução aquosa.

O equipamento usado está ilustrado na **Figura 3.7**.



Figura 3.7. Espectrofotômetro de Absorção Atômica SOLAAR Thermo Electron Corporation M Series, com chama de acetileno/ar

4. Discussão e Apresentação de Resultados

Nesta secção serão apresentados e discutidos todos os resultados decorrentes da realização experimental, desde as sínteses, passando pela caracterização dos dois substratos de papel, assim como à caracterização destes contendo os vários tipos de nanopartículas. Através dos testes de sensibilidade aos antibióticos será selecionado o papel que tiver uma melhor eficácia bactericida, para depois, com amostras de água contaminada e através do método de filtração por membrana avaliar quer a viabilidade da água em termos bacteriológicos quer em termos de toxicidade das np's.

4.1. Caracterização dos substratos de papel

Uma vez que neste trabalho se pretende funcionalizar o papel com np's, é importante fazer uma caracterização não só morfológica mas também composicional e estrutural do papel para se perceber o tipo de interacção que as np's terão com este. Como já foi mencionado, os dois tipos de papel usados foram o papel de filtro de café e os discos comerciais.



Figura 4.1. Discos comerciais.

4.1.1. Caracterização Morfológica

■ Microscopia Electrónica de Varrimento

Na **Figura 4.2.** apresenta-se a morfologia dos dois substratos de papel utilizados.

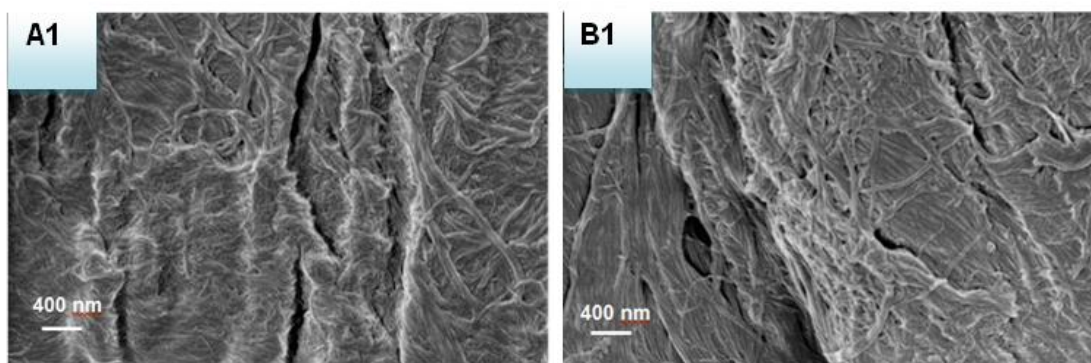


Figura 4.2. Imagens SEM do papel de filtro de café (A1) e do disco comercial (B1)

Observando a **figura 4.2**, mais especificamente o papel filtro de café (**A1**), vê-se que é um papel muito poroso. Já em relação aos discos comerciais (**B1**), estes apresentam uma maior espessura comparativamente com o papel de filtro de café (0,775 mm contra $0,202 \text{ mm} \pm 0,001$), parâmetro esse que vai fazer a diferença, uma vez que tendo o mesmo diâmetro que o papel de filtro vai albergar uma maior quantidade de np's função do tipo de impregnação utilizada neste trabalho. Através desta técnica é possível avaliar as superfícies dos dois tipos de papel em termos morfológicos.

Sendo que o papel é fundamentalmente constituído pelas fibras de celulose, pela visualização destas imagens verifica-se que os dois substratos são constituídos por uma malha tridimensional de fibras de celulose.

Comparando as imagens do papel de filtro de café com as dos discos comerciais observa-se que apesar de ambos serem um emaranhado de fibras celulósicas sem orientação, e portanto com uma forma irregular, no papel de filtro de café vê-se que as fibras não são tão densas e não estão tão juntas comparativamente com as imagens dos discos comerciais.

Tal é concordante com a observação à macroescala destes discos, que têm uma maior espessura, e portanto, uma maior densidade, o que faz, à partida com que as fibras que os constituem também sejam mais densas; Já em relação à questão das fibras não estarem tão juntas no papel de filtro de café é justificado pela finalidade deste, que é filtrar café, e portanto, tem de ser poroso e apresentar um maior espaçamento entre as fibras. As fibras de celulose apresentam uma forma tubular com cerca de 1,5 mm de comprimento, 20 μm de diâmetro e 2 μm de espessura. (Costa, 2012)

4.1.2 Caracterização Estrutural

■ Difracção de raios - x

Com a técnica de Difracção de raios-X identificaram-se os dois substratos de papel em termos estruturais, avaliando, assim, a cristalinidade de cada um deles.

Através dos difractogramas obtidos, e pela análise da ficha de referência da celulose do tipo I 00-056-1718, verifica-se que os dois substratos apresentam picos característicos da estrutura cristalina da celulose do tipo I.

No papel filtro de café identificaram-se 3 picos a $14,8^\circ$, $22,9^\circ$, e $34,5^\circ$, correspondendo aos planos cristalográficos (-110), (200) e (004), respectivamente.

No disco comercial identificou-se mais dois picos do que no substrato anterior, estando estes localizados a $16,7^\circ$, correspondendo ao plano (110) e o outro a $46,7^\circ$, correspondendo ao plano (018). Este último pico deve-se à presença do carbonato de cálcio, que é um aditivo comum usado no fabrico do papel.

De notar que o facto dos picos de ângulos a $14,8^\circ$ e $16,7^\circ$ serem mais definidos no caso do substrato do disco comercial por comparação com o papel de filtro de café, se deve à quantidade de celulose, isto é, quando as fibras de celulose contêm elevadas quantidades de materiais amorfos - lenhina e hemicelulose, estes dois picos fundem-se, aparecendo um único pico largo concluindo-se que o disco comercial é mais rico em celulose e portanto, mais cristalino.

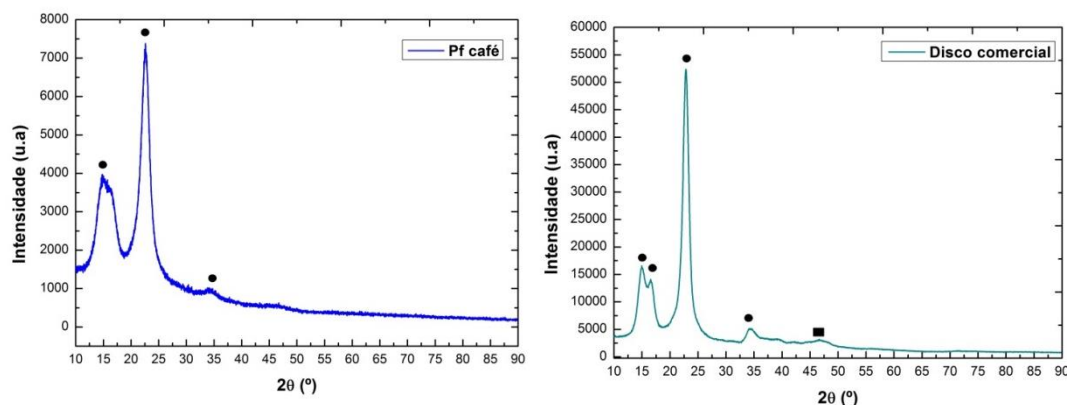


Figura 4.3. Difractogramas obtidos para os dois substratos de papel usados na realização experimental: à esquerda: papel de filtro de café e à direita: disco comercial, onde as bolas pretas representam os picos típicos para a celulose do tipo I, e o quadrado um pico correspondente ao carbonato de cálcio.

Neste sentido, foram calculados os índices de cristalinidade para cada substrato, em que o índice de cristalinidade é dado por: (Soares, 2013)

$$ICr(\%) = \frac{I_{(002)} - I_{(am)}}{I_{(002)}} \times 100$$

Equação 4.1.

onde $I_{(002)}$ corresponde ao valor de intensidade máxima do pico observado para o ângulo $2\theta = 22,9^\circ$, $I_{(am)}$ é a intensidade correspondente à componente amorfa, que para os substratos em estudo se verifica para um ângulo $2\theta = 18^\circ$.

Assim, o índice de cristalinidade para o papel de filtro de café será de 76 % e para o disco comercial de 88,5 %, tal como era esperado.

Esta conclusão vai de encontro com o que foi mencionado anteriormente, no que diz respeito à fusão dos dois picos no papel de filtro de café, o que indicava um menor conteúdo em celulose, sendo portanto menos cristalino

4.1.3. Caracterização Térmica

■ Calorimetria Diferencial de Varrimento e Termogravimetria

Na **Figura 4.4** tem-se a ilustração da calorimetria diferencial de varrimento do papel de filtro de café (**à esq.**) podendo-se identificar dois picos endotérmicos: o primeiro, ocorre a uma temperatura de $83,6^\circ\text{C}$, correspondendo a uma entropia de $0,4336\text{ mW/mg}$, que é devido à perda do substrato de 7,10%, como se pode verificar na figura 4.5. (**à esq.**) Essa perda corresponde à evaporação de água, o que pode ser confirmado pela temperatura a que ocorre.

Já o segundo pico endotérmico, a $347,0^\circ\text{C}$, corresponde à degradação da celulose, sendo esta a principal componente do papel, e portanto a perda de massa já foi de 75,52 %.

Por fim, a massa residual foi de 16,01 %, a $550,8^\circ\text{C}$.

Já em relação à calorimetria diferencial de varrimento para o disco comercial (**figura 4.4 à dir.**) também se identificam dois picos endotérmicos, sendo que o primeiro ocorre para uma temperatura de $43,0^\circ\text{C}$, com uma entropia de $0,1317\text{ mW/mg}$, estando-lhe associado uma perda de massa de 5,41 %.

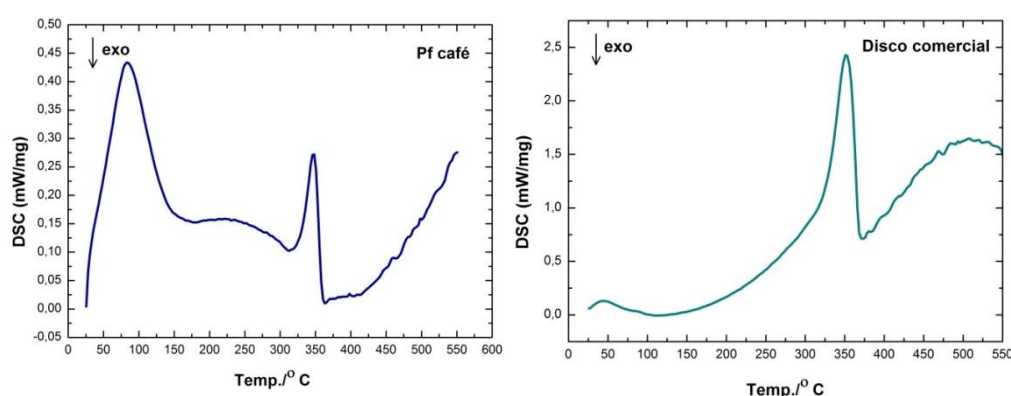


Figura 4.4. Calorimetria diferencial de varrimento realizada para os dois papéis : **à esq.** para o papel de filtro de café e **à dir.** para o disco comercial.

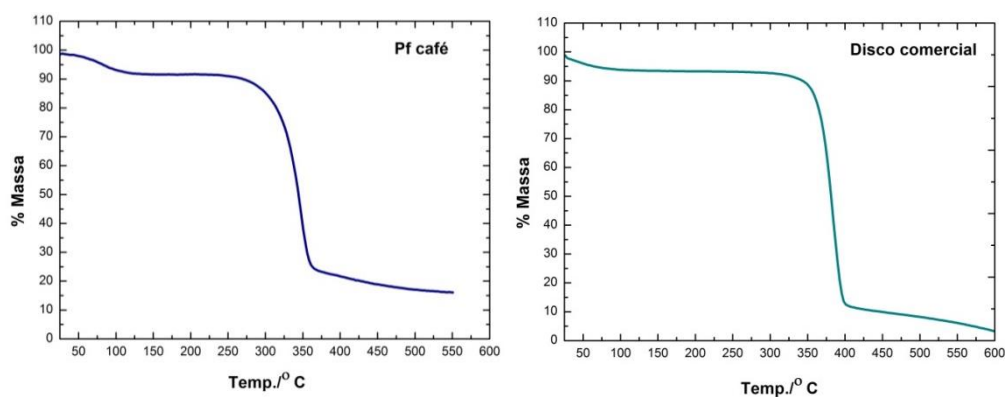


Figura 4.5. Termograma realizados para os dois substratos de papel: : à esq. para o papel de filtro de café e à dir. para o disco comercial.

O segundo pico, ocorre a uma temperatura próxima da do papel de filtro de café, a 352,0 ° C, estando também, na gama de temperatura de degradação da celulose (Costa, 2012)

Através da **Figura 4.5 (à dir.)** é possível verificar que a este pico está associada uma perda de massa de cerca de 90 %, restando apenas 3% da massa total.

Esta análise termogravimétrica vem de encontro com o que foi constatado na difracção de raios-x, na medida em que a percentagem de perda da celulose foi maior, o que indica que tem maior conteúdo em celulose, confirmando uma maior cristalinidade quando comparada com o papel de filtro de café.

Não obstante, o facto de este substrato ter uma maior espessura do que o papel de filtro de café também contribui para um possuir um maior conteúdo deste polímero.

4.2. Caracterização do papel funcionalizado com nanopartículas

Na funcionalização das fibras de celulose foram utilizadas np's de prata, em que estas foram sintetizadas por duas metodologias diferentes, variando o tipo de redutor e também a concentração de precursor, AgNO₃. Em relação às np's sintetizadas de óxido de zinco, a gama de variação de concentrações de precursor, acetato de zinco di-hidratado já foi maior, de 1 a 100 mM.

Já as np's contendo np's de prata e óxido de zinco, uma vez que estas já albergam dois tipos de metais diferentes na sua constituição, manteve-se a concentração para 10mM.

Por fim, impregnaram-se também np's comerciais nas fibras celulósicas, tais como np's de cobre, óxido de tungsténio e óxido de zinco.

4.2.1. Caracterização do papel funcionalizado com Nanopartículas de Prata

⇒ *"In situ"*

Caracterização Morfológica

■ Microscopia Electrónica de Varrimento

Na **Figura 4.6** apresentam-se as imagens resultantes dos papéis onde se realizou a síntese das np's de prata *"in situ"*.

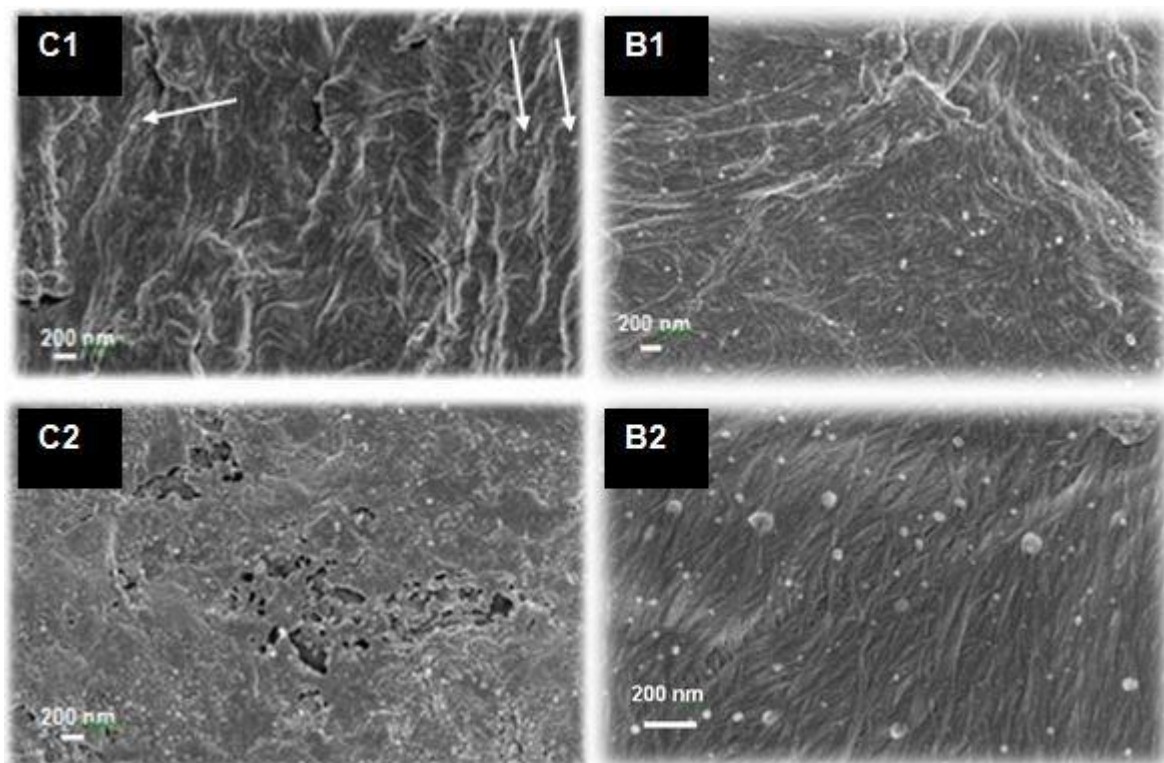


Figura 4.6. Imagens SEM do papel filtro de café resultante da síntese de np's "in situ" via citrato de sódio para $[AgNO_3] = 1mM$ (C1) e $10mM$ (C2) e com e borohidreto de sódio (B1 e B2)

Na **Figura 4.6** têm-se as imagens SEM resultantes da síntese de np'sAg "in situ" com $[AgNO_3] = 1mM$ via citrato de sódio e com e borohidreto de sódio, em que se pode verificar que na síntese com o citrato de sódio quase não se identificam np's. Já na síntese com o borohidreto de sódio, estas encontram-se bem visíveis e com tamanhos que vão desde 20 a 50 nm. Aumentando a concentração de $[AgNO_3]$ para 10 vezes, na síntese com citrato já se visualizam bem as np's, no entanto, a maior parte, numa forma agregada. Os tamanhos vão de 30 a aproximadamente 100 nm. Em relação ao papel contendo as np'sAg com borohidreto de sódio, a imagem mantém-se consistente com a imagem ilustrando o papel com a menor concentração, (B1) cujos tamanhos já permanecem entre 40 e 70 nm. De um modo geral, comparando as sínteses em relação ao tipo de agente redutor usado pode-se concluir que as np's sintetizadas via citrato apresentaram-se agregadas, nomeadamente com o aumento da concentração, comparativamente com a síntese efectuada com o outro agente redutor. A agregação deveu-se às altas temperaturas usadas no decorrer da síntese, uma vez que esta é um dos parâmetros que influencia o tamanho das np's.

Caracterização Estrutural

■ Difracção de Raios-X

Na **figura 4.7** têm-se os difractogramas para o papel de filtro de café com as np'sAg, cuja concentração de $AgNO_3$ foi de 1 e 10 mM via citrato e via borohidreto de sódio "in situ", sendo adquiridos para ângulos de 2θ entre os 10 e 85 °.

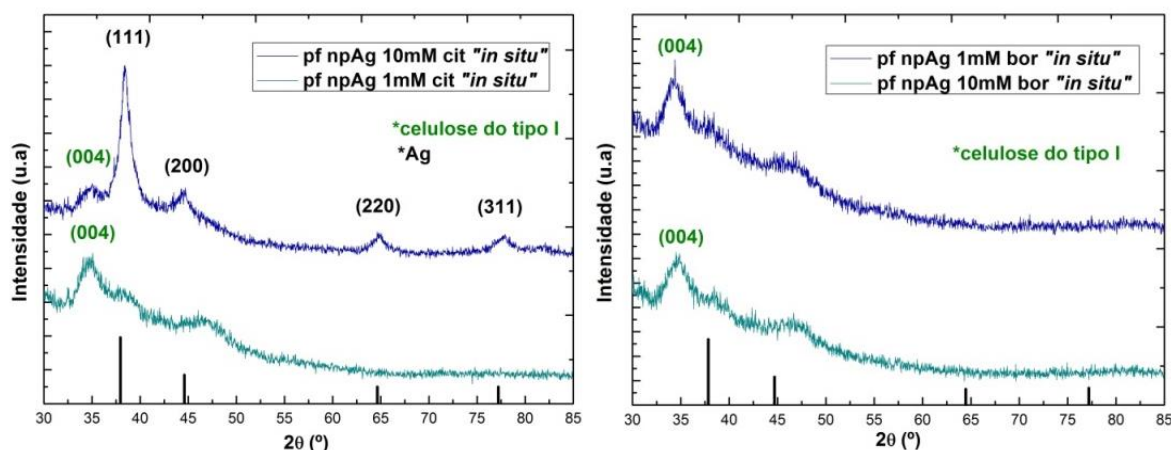


Figura 4.7. Difractogramas para **À esq:** o papel de filtro de café com np'sAg cuja concentração de precursor, AgNO_3 , varia de 1 e 10mM via citrato "in situ"; **à dir:** papel de filtro de café com npAg de concentração 1 e 10 mM (com as mesmas concentrações de precursor) via borohidreto de sódio "in situ".

Em relação ao difractograma do papel de filtro de café com np'sAg, em que $[\text{AgNO}_3] = 1$ e 10 mM via citrato "in situ", verifica-se um pico a $34,6^\circ$, que é um pico característico da celulose do tipo I, cujo plano correspondente é o plano (004), e através da ficha de referência da prata de código 00-004-0783 apenas se conseguem identificar os picos típicos da prata para a maior concentração, assim como os planos cristalográficos correspondentes, os quais correspondentes a uma estrutura cristalina cúbica. Uma vez que o pico com maior intensidade (para $2\theta = 38,4^\circ$) se encontra bem definido, foram calculados os tamanhos médios da cristalite, D , de maneira a estimar o tamanho médio das np's de Ag para esta concentração através do uso da equação de Debye-Scherrer:

$$D = \frac{0,9\lambda}{B\cos\theta} \quad \text{Equação 4.2.}$$

Onde λ é o comprimento de onda da radiação de raios-X (neste caso, $\lambda_{\text{Cu-K}\alpha} = 1,540598 \text{ \AA}$), θ é o ângulo de difracção de Bragg e B é a largura a meia altura do pico de difracção (em radianos).

Com os cálculos efectuados, determinou-se que as np's apresentaram um tamanho médio de 47 nm, o que é concordante com os tamanhos visualizados através das imagens obtidas pela microscopia electrónica de varrimento.

Em relação aos papéis cuja síntese de np'sAg foi realizada com o borohidreto de sódio, apenas se identificou o pico correspondente à celulose do tipo I, não sendo possível verificar os picos correspondentes à prata.

Caracterização Térmica

■ Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) e Termogravimetria (TG)

Na **Figura 4.8** apresenta-se o gráfico respeitante à calorimetria diferencial de varrimento (**à esq.**) assim como o termograma (**à dir.**) para o papel de filtro de café com np'sAg com $[\text{AgNO}_3] = 1$ e 10 mM via citrato de sódio "in situ", por comparação com o papel de filtro de café, conseguindo-se identificar um pico endotérmico a entre 75 e 90°C , que corresponde a uma perda de massa que ronda os 7%. Para temperaturas de 325 a 350°C , e considerando os dois papéis com np's de prata, identificam-se dois picos exotérmicos, sendo o pico correspondendo ao papel com a concentração mais elevada mais intenso. Por comparação com o papel de filtro de café sem nada, que apresenta um pico endotérmico nesta gama de temperaturas, e que, como já foi visto anteriormente que o mesmo corresponde à degradação da celulose, deduz-se que os picos também correspondem à degradação da celulose. O facto de apresentarem picos exotérmicos, e portanto, entropias negativas relaciona-se com as np'sAg, na medida em que, estas sendo metálicas, aquecem o papel e libertam energia. Já em relação à análise termogravimétrica, numa fase inicial tem-se uma perda de massa de 7%, que corresponde à evaporação de água, seguindo-se uma perda de massa de 62 e 67 % para os papéis com a menor e maior

concentração de npAg, respectivamente, e por fim, a maior percentagem de massa residual ocorre para o papel de maior concentração. De salientar, ainda, que a degradação dos papéis contendo as np's de prata ocorre a uma temperatura significativamente mais baixa por comparação com o papel de filtro de café o que é devido ao facto de a prata ser um metal, e portanto, bom condutor térmico, o que faz com que o papel se degrade mais rapidamente.

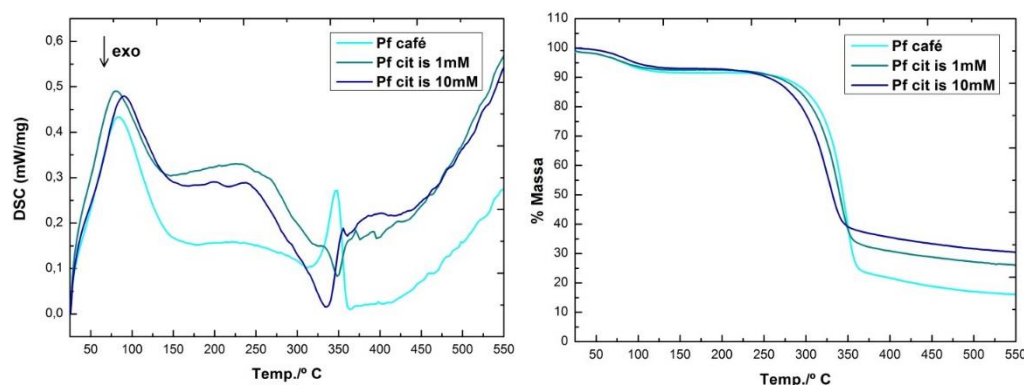


Figura 4.8. Calorimetria diferencial de varrimento (à esq.) e análise termogravimétrica (dir.) para o papel de filtro de café, papel de filtro de café com npAg com $[AgNO_3] = 1$ e 10mM via citrato "in situ".

Caracterização Morfológica

■ Microscopia Electrónica de Varrimento

⇒ Via impregnação

Nas **Figuras 4.9 e 4.10** apresentam-se as imagens SEM para os papéis impregnados com as suspensões de np'sAg.

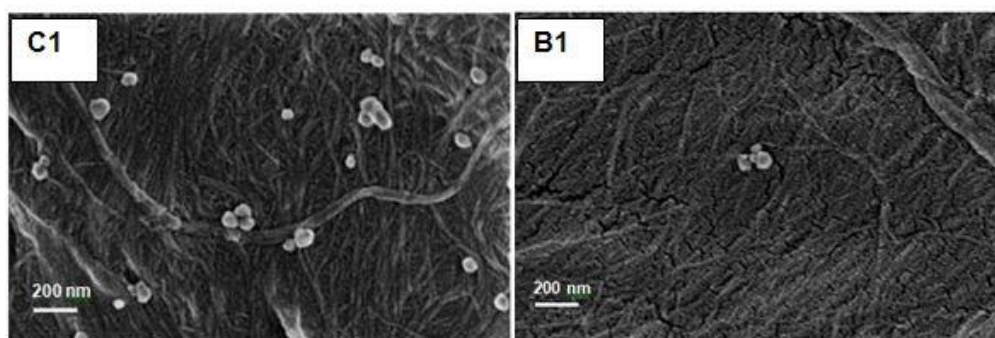


Figura 4.9. Imagens SEM do papel de filtro de café impregnado durante 30 minutos com a suspensão de np'sAg com $[AgNO_3] = 1$ mM com citrato de sódio (**C1**) e **B1** com a suspensão de npAg com $[AgNO_3]$ de concentração 1mM com borohidreto de sódio

Nas **Figuras 4.9 e 4.10**, apresentam-se as imagens SEM para os papéis impregnados com a suspensão de np'sAg usando diferentes concentrações e diferentes redutores.

Na **figura 4.9** pode-se visualizar que para um tempo de impregnação de 30 minutos, e com uma concentração da suspensão de npAg's com $[AgNO_3] = 1$ mM, o papel que reteu mais nanopartículas foi o papel que foi impregnado com a suspensão em que se utilizou o citrato de sódio como agente redutor, em que as np's apresentam um tamanho médio de 50 nm, assim como uma geometria esférica, encontrando-se, algumas, agregadas. Em relação ao papel impregnado a suspensão em que se utilizou o borohidreto de sódio, praticamente não se veem np's na superfície do papel, e as que se veem, encontra-se agregadas.

Contudo, estas apresentam um tamanho inferior às np's sintetizadas via citrato de sódio. Quando se aumenta a concentração da suspensão das np's para $[AgNO_3] = 10 \text{ mM}$ via citrato de sódio, **na Figura 4.10.C.** é possível verificar-se que para o menor tempo de impregnação não se identificam praticamente np's; a partir de 20 minutos de impregnação já se verificam uma boa quantidade de np's dispersas nas fibras de celulose.

Em relação à **figura 4.10B**, vê-se uma quantidade razoável de np's independentemente do tempo de impregnação.

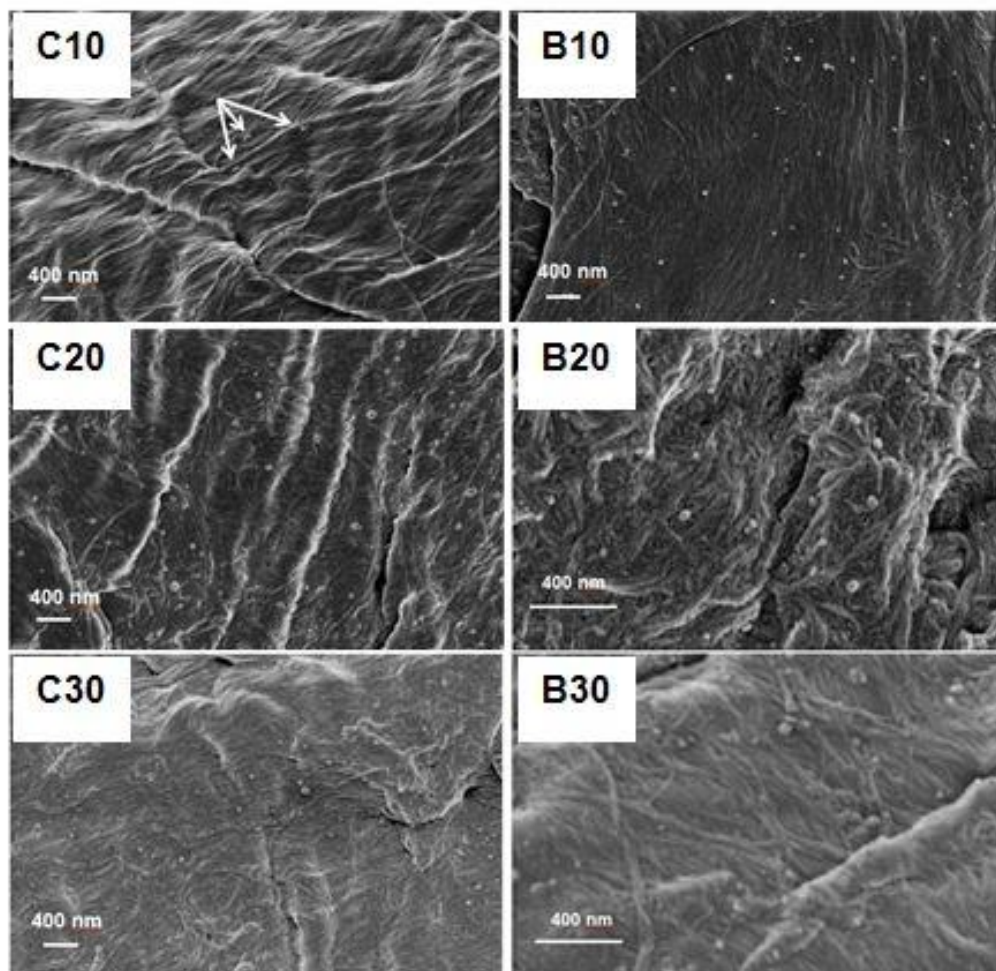


Figura 4.10. Imagens SEM do papel de filtro de café com npAg com $[AgNO_3] = 10 \text{ mM}$ com citrato de sódio (à **esq.**) por ordem crescente de tempo de impregnação: **C10, C20 e C30** correspondem a 10, 20 e 30 min, respectivamente e com borohidreto de sódio (à **direita**).

Caracterização Óptica

■ Espectrofotometria UV-Visível

As suspensões de np's metálicas exibem bandas de absorção na região de UV-Visível, mais especificamente, no caso de serem np's de prata, a banda de absorção ocorre para um comprimento de onda de 420 nm. (Pillai & Kamat, 2004) Não obstante, de acordo com a **Figura 4.11**, os picos de absorção situam-se na gama de 400 a 450 nm. Na **Figura 4.11**, tem-se o espectro de absorvância para as suspensões de np'sAg via citrato de sódio (à **esq.**) e para as suspensões via borohidreto de sódio, medido num comprimento de onda entre 300 e 900 nm.

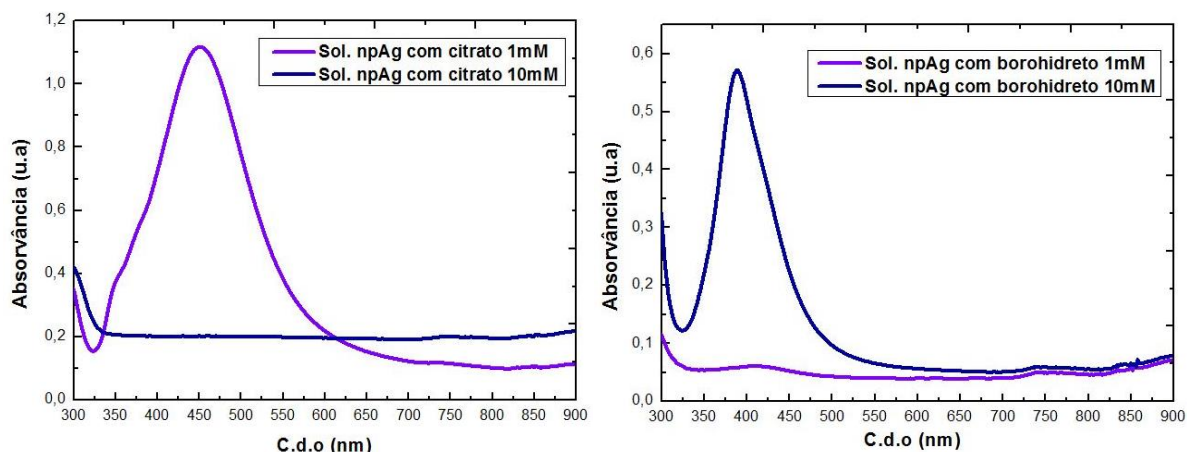


Figura 4.11. Espectros de Absorvância para as suspensões de np'sAg via citrato de sódio (**à esq.**) e para as suspensões via borohidreto de sódio (**à direita**)

Analisando os espectros de absorvância para as suspensões de npAg via citrato de sódio (**à esq.**), para a menor concentração, verifica-se que o pico de absorvância ocorre para um comprimento de onda de 450 nm, indicando um maior tamanho de np's, pois com o aumento do tamanho das nanopartículas o pico do espectro de absorvância desvia-se para maiores valores de comprimentos de onda (Solomon et al., 2007). Em particular, o pico máximo de absorvância para a síntese de np'sAg com o citrato de sódio costuma rondar os 420 nm, em que os tamanhos se encontram na gama de 50 a 100 nm (Pillai & Kamat, 2004), o que é concordante com alguns dos tamanhos visualizados nas imagens SEM, que vão de 60 a 73 nm.

Para a maior concentração não se verificam picos de absorção, devido possivelmente ao elevado estado de agregação das np's, como foi visualizado nas imagens obtidas pela microscopia electrónica de varrimento. Assim, com o elevado estado de agregação das np's, estas depositaram e o que se vê para esta concentração nada mais é do que a linha de base do solvente, pois atendendo aos valores de absorvância, a linha aproxima-se do zero.

Já em relação aos espectros de absorvância para as suspensões de npAg via borohidreto de sódio (**à dir.**), o pico de absorção desta vez ocorre para a maior concentração da suspensão, para um comprimento de onda de 400 nm, o que é concordante com o pico máximo observado para o espectro de absorvância realizado para as np's de prata sintetizadas pelos autores Pillai & Kamat. Este pico de absorção ocorre, assim, para um comprimento de onda inferior ao do pico de absorção observado para a suspensão via citrato de sódio, com a concentração de 1 mM. Posto isto, e através das imagens SEM, confirma-se que estas np's apresentam tamanhos inferiores às sintetizadas via citrato de sódio, apresentando tamanhos que vão de 30 a 60 nm aproximadamente.

No que diz respeito á menor concentração, não ocorre nenhum pico de absorção, provavelmente devido ao facto de existirem muito poucas np's na superfície do papel, dado que a concentração é baixa.

Tal facto é concordante com a **Figura 4.10 (à dir.)**, em que praticamente não se observam np's entre as fibras celulósicas.

Caracterização Estrutural

■ Difracção de Raios-X

Nas **Figuras 4.12 e 4.13** apresentam-se os difractogramas obtidos para os papéis impregnados com as suspensões de np'sAg com $[AgNO_3] = 1\text{ mM}$ e 10 mM , respectivamente.

Através da ficha de referência da prata de código 00-004-0783, apenas se se conseguem identificar os picos da prata para os papéis impregnados com a suspensão de np'sAg via citrato de sódio, em que para a menor concentração (**Fig. 4.12 à esq.**), apenas se identificou um pico característico nos três papéis; Atendendo aos papéis impregnados com a maior concentração, conseguiram-se observar dois picos, para ângulos 2θ de $38,4^\circ$ e $44,4^\circ$.

Para além destes, identificaram-se outros, que se deduz serem do nitrato de prata, pois os ângulos onde ocorrem estes picos são coincidentes com os ângulos identificados na ficha de referência do nitrato de prata de código 00-049-1239 para onde ocorrem os picos de nitrato de prata.

Relativamente aos papéis impregnados com a suspensão de borohidreto de sódio, não se identificaram os picos característicos da prata, independentemente da concentração, o que pode indicar uma fraca adesão à matriz celulósica.

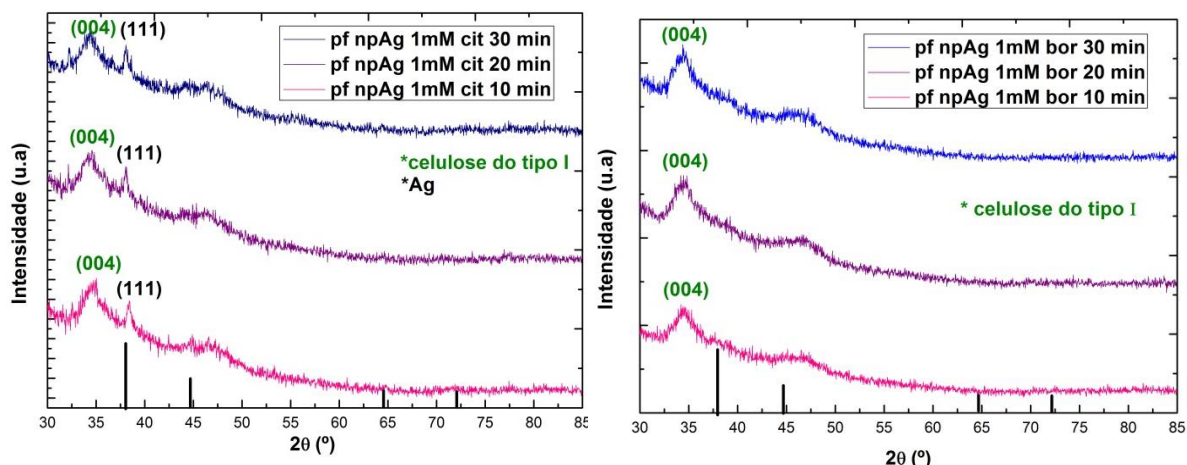


Figura 4.12. Difractogramas para o papel de filtro de café impregnado por diferentes tempos com a suspensão de npAg com $[AgNO_3] = 1\text{ mM}$ via citrato (à esq.) e para o papel de filtro de café impregnado com suspensão de npAg com $[AgNO_3] = 1\text{ mM}$ via borohidreto de sódio (à dir.)

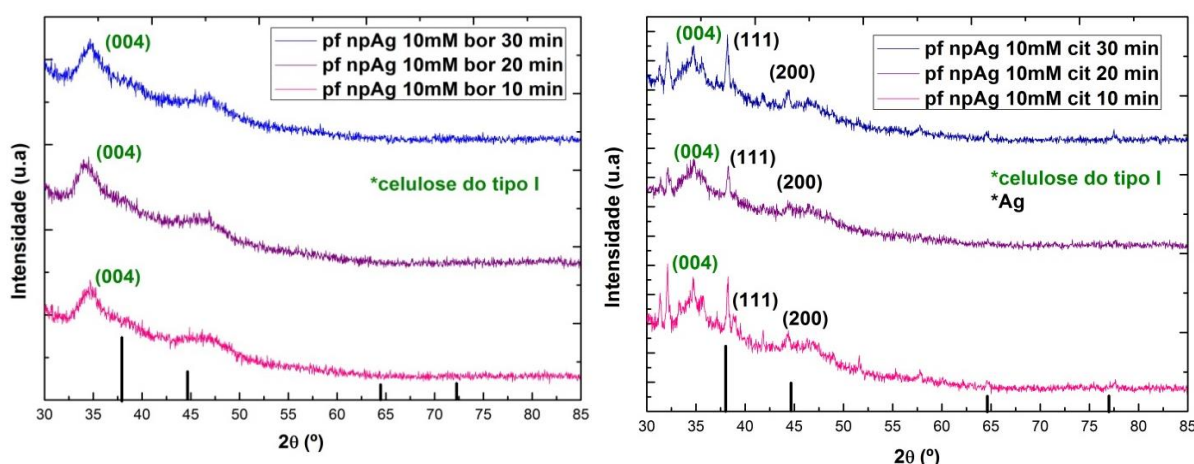


Figura 4.13. Difractogramas para o papel de filtro de café impregnado por diferentes tempos com a suspensão de npAg com $[AgNO_3] = 10\text{ mM}$ via citrato (à esq.) e para o papel de filtro de café impregnado com suspensão de npAg com $[AgNO_3] = 10\text{ mM}$ via borohidreto de sódio (à dir.)

Caracterização Térmica

■ Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) e Termogravimetria (TG)

Na **Figura 4.14**, apresenta-se o gráfico respeitante à calorimetria diferencial de varrimento (à esq.) assim como o termograma (à dir.) para o papel de filtro de café impregnado por 10, 20 e 30 minutos na suspensão de npAg, partindo de $[AgNO_3] = 10\text{ mM}$ via citrato de sódio. Por comparação com o papel de filtro de café, consegue-se identificar um pico endotérmico entre 75 e 90° C, que corresponde a uma perda de massa que ronda os 7%. Com o aumento da temperatura, para temperaturas na gama de 325 a 350° C, e considerando os três papéis impregnados com a suspensão de npAg, verifica-se que os seus comportamentos não são unânimes, na medida em que para o papel impregnado por 10 minutos se verifica um pico endotérmico para 345° C, já o papel impregnado por 20 min apresenta dois picos endotérmicos, entre 300 e 340° C, e o papel com o maior tempo de impregnação apresenta um pico exotérmico a 323° C. Na **Figura 4.14** (à dir.) verifica-se que ocorre uma grande perda de massa entre

240 e 340° C, cuja gama de temperaturas é a mesma para onde ocorrem tais picos, deduzindo-se que, apesar das diferenças entrópicas nos picos para os papéis impregnados, o fenómeno ocorrido tenha sido a degradação da celulose.

Pela análise do termograma também se constata o mesmo fenómeno verificado para os papéis cuja síntese de np'sAg foi realizada "*in situ*", isto é, a degradação dos papéis impregnados ocorre a uma temperatura inferior ao papel de filtro de café (controlo), o que é devido à presença da prata, que, sendo um bom condutor térmico, vai aquecer o papel mais rapidamente à medida que se aumenta a temperatura.

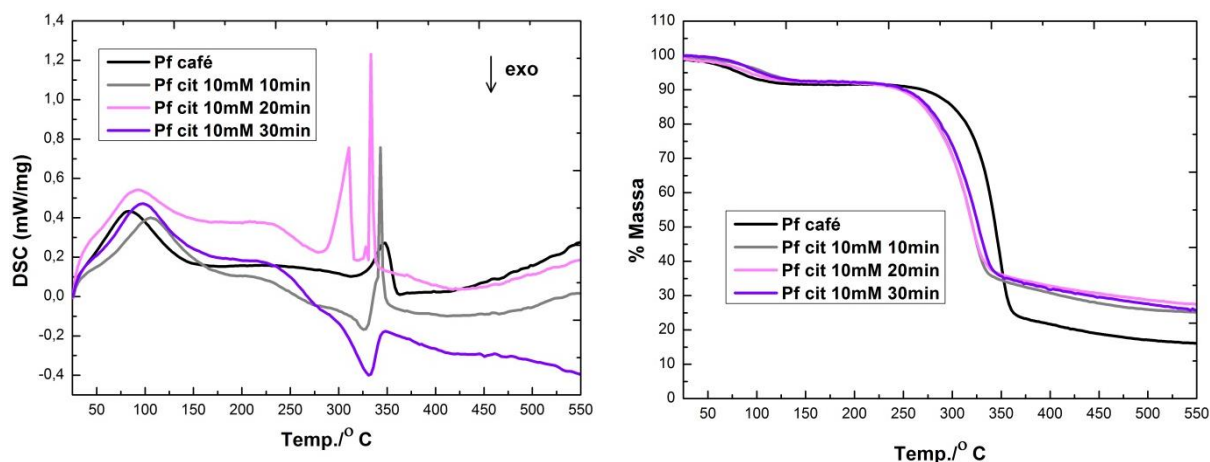


Figura 4.14. Calorimetria diferencial de varrimento (à esq.) e análise termogravimétrica (dir.) para o papel de filtro de café.

4.2.2. Caracterização do papel funcionalizado com np's de óxido de zinco

Estas np's foram sintetizadas directamente no papel de filtro de café – metodologia "*in situ*". Uma vez que o óxido de Zinco surge na literatura como um material que é "sensível" à radiação ultravioleta, e, portanto, pode ser activado por esta, pensou-se que seria interessante submeter os papéis à radiação ultravioleta para ver se haveria diferenças com o papel sem tratamento, nomeadamente no efeito antibacteriano, avaliado mais adiante. Com isto, também se avalia a vantagem de esterilizar o papel. De forma a estar nas mesmas condições, nomeadamente em termos de esterilização, também se esterilizou o papel pela autoclave, cujas condições de esterilização foram : A temperatura a 121 °C, e a Pressão = 15 psi.

Caracterização Morfológica

■ Microscopia Electrónica de Varrimento

Na **Figura 4.15.** podem-se visualizar as imagens SEM obtidas para os papéis contendo ZnO, de 1, 5, 10, 50 e 100 mM, em que para **A** se têm os papéis sem esterilização, para **B** os papéis autoclavados, e **C** papéis com esterilização uv. Os números indicam a concentração, por ordem crescente.

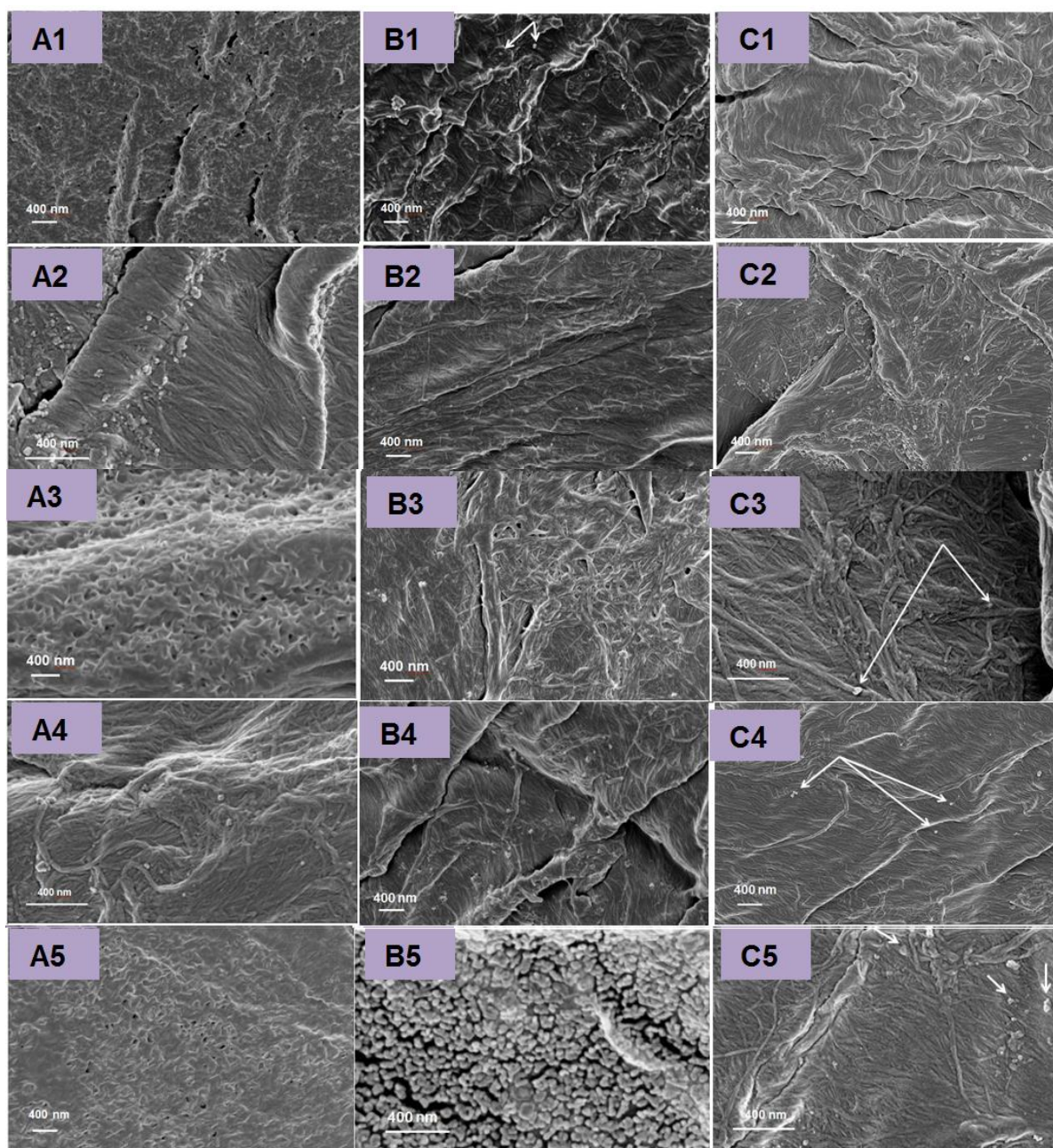


Figura 4.15. ilustração das imagens SEM para os papéis contendo ZnO, de 1, 5, 50 e 100 mM, em diferentes condições : **A** - sem esterilização; **B** – com autoclavagem ; **C** – esterelizados por luz uv

Por observação das imagens SEM, representadas na **Figura 4.15**, constata-se que há medida que se aumenta a concentração, se veêm mais np's de ZnO, há excepção do papel de filtro de café que contém uma concentração de np's de ZnO de 50mM. Tal facto pode ter que ver com uma distribuição não homogênea das np's pela superfície do papel.

Em relação aos papéis com esterilização pela autoclave, (**B1**, **B2**, **B3**, **B4** e **B5**) nas imagens **B1** e **B2** não se verificam diferenças comparando com o papel sem esterilização; a partir de **B3** vê-se que já não existe tanta quantidade de np's no papel, em **B4** veêm-se algumas np's e no papel com 100 mM (**B5**) vê-se que as np's se encontram num estado de agregação elevado.

Nos papéis com esterilização por radiação UV (**C1**, **C2**, **C3**, **C4** e **C5**) quase não se verificam np's nos papéis; no entanto, no papel contendo a concentração de 5 mM (**C2**) ainda se veêm algumas.

Comparando os dois tipos de esterilizações, apesar de a autoclavagem ser um processo mais abrasivo do que a esterilização por radiação UV, constata-se que os papéis ainda exibem uma quantidade razoável de np's, ao invés dos papéis esterilizados por luz uv, practicamente não se veêm nenhuma.

Já em relação à morfologia, esta depende do tipo de síntese efectuada, atendendo a variáveis reaccionais como temperatura, concentração e tipo de precursores utilizados.

No que diz respeito à imagem **A5** verifica-se que as np's apresentam uma morfologia similar a "grãos-de-arroz", no entanto, olhando para a imagem **B5**, em que o papel é submetido a altas temperaturas, as np's passam a ter uma forma esférica. Tal é concordante com as conclusões a que os autores (Wang, Zhou, Zhang, & Yao, 2013) chegaram, que salienta a importância da temperatura na morfologia das np's.

Por analogia à imagem **A3**, constata-se que a morfologia de ambas as np's é muito semelhante, apresentando uma forma similar às np's obtidas num estudo efectuado pelos autores (Tang, 2013) e (Hu et al., 2010) em que se usou como precursor o acetato de zinco, comprovando que o tipo de precursor usado também determina a morfologia.

Neste último estudo, cuja técnica de síntese de np's de ZnO foi a utilizada neste trabalho experimental, os autores constataram que para uma concentração de 10 mM de precursor (acetato de zinco di-hidratado) se obtiveram as np's de ZnO, muito semelhantes às obtidas na imagem A3.

No entanto, quando aumentaram a concentração para o dobro, obtiveram partículas com uma morfologia diferente, que correspondiam a acetato de zinco e não np's de ZnO.

Com isto, evidencia-se assim mais um parâmetro importante na morfologia: a concentração.

Caracterização Estrutural

■ Difracção de raios-X

A caracterização em termos estruturais foi feita através da difracção de raios-X.

Nas **Figuras 4.16., 4.17 e 4.18** têm-se os difractogramas para os papéis sem esterilização, com esterilização pela autoclave, e com esterilização por radiação UV, onde se podem visualizar os picos característicos para o papel de filtro de café sem nada e com as várias concentrações da mistura reaccional de acetato de zinco em acetona (**nas Figuras 4.16 e 4.18**)

Na **Figura 4.16.** conseguem-se identificar dois picos típicos da celulose do tipo I, para todas as amostras, a 16,4° e 22,6°, correspondendo aos planos cristalográficos (101) e (002).

Em relação às np's presentes nos papéis estas não são de ZnO mas sim de acetato de zinco, o reagente usado na síntese.

No entanto, tais picos, só são identificados a partir de uma concentração da mistura reaccional de 10 mM.

Nos papéis contendo estas três concentrações (10, 50 e 100 mM) identificaram-se os picos de acetato de zinco a 11,2° e 19,6°, correspondendo aos planos cristalográficos (110) e (112), através da ficha de referência do acetato de zinco 00-033-1464.

Contudo, constata-se que a intensidade dos picos é maior no papel contendo a menor concentração (10 mM).

Comparando os papéis com a concentração da mistura reaccional de 50 e de 100 mM verifica-se que o papel com concentração superior possui um pico "a mais", um pico a 12,4°, de acetato de zinco di-hidratado, cujo plano cristalográfico (200). Esta identificação foi feita de acordo com a ficha de referência para o acetato de zinco hidratado 00-033-1464.

A ocorrência deste pico pode ser explicada pelo facto de uma maior concentração (neste caso o dobro) ter maior quantidade de soluto (acetato de zinco hidratado) e portanto, ter havido uma sobressaturação, e como consequência, a não dissolução em acetona.

Os autores salientaram como explicação a rápida evaporação da água e acetona, e a sobressaturação do acetato de zinco, evitando a hidrólise deste, e consequente deposição. (Hu et al., 2010).

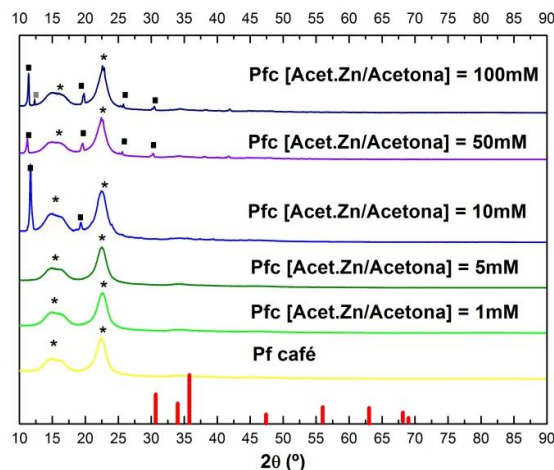


Figura 4.16 Difractograma do papel filtro de café sem nada e com os papéis impregnados com as diferentes concentrações da mistura reaccional, onde os **asteriscos (*)** representam os picos relativos à celulose do tipo I, os **quadrados pretos** os picos referentes ao acetato de Zinco e os **quadrados cinzentos** os picos do acetato de zinco di-hidratado.

Já em relação à **Figura 4.17**, que contém os papéis esterilizados pela autoclave, por analogia à **Figura 4.16**, identificaram-se os mesmos picos da celulose.

Com o processo de autoclagem formaram-se as np's de ZnO, conseguindo-se identificar os picos característicos em todas as concentrações, porém, a intensidade dos picos no papel foi maior no papel contendo a concentração de np's de ZnO de 10 mM, e menor nos papéis com concentrações de 5 e 50 mM.

Os picos foram identificados de acordo com a ficha de referência para o óxido de zinco – 00-036-1451 ocorrendo picos para um ângulo 2θ de $31,770^\circ$, $34,422^\circ$ e $36,253^\circ$, relativos aos planos (100), (002), e (101).

No papel com $[np'sZnO] = 10 \text{ mM}$, identificaram-se ainda os picos a $47,56^\circ$, $56,6^\circ$, $62,8^\circ$, $67,9^\circ$, e $69,1^\circ$, correspondendo aos planos (102), (110), (103), (112), e (201).

A presença destes picos define a estrutura cristalina do ZnO como a mais comum, a estrutura hexagonal (wurtzite).

De modo a estimar o tamanho médio das np's de ZnO, nas várias concentrações determinaram-se os tamanhos médios das cristalites (D) a partir dos picos, através do uso da equação de Debye-Scherrer.

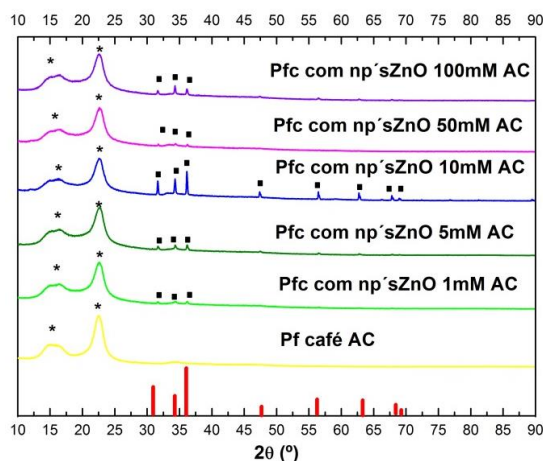


Figura 4.17. À Esquerda: Difractograma do papel filtro de café sem nada, esterilizado por autoclave, e dos papéis impregnados com as diferentes concentrações de np'sZnO, tendo sido autoclavados, onde os **quadrados pretos** representam os picos referentes ao óxido de Zinco e os **asteriscos** os picos relativos à celulose do tipo I.

Os tamanhos estimados não foram os esperados, na medida em que não foram consensuais, pois, à medida que se aumenta a concentração, espera-se que haja uma maior agregação das np's e consequentemente um maior tamanho. Não é assim, o que o DRX dá é o tamanho da cristalite e não o tamanho de grão. A cristalite é que difracta a radiação, um grão é um conjunto de cristalites.

Ora, tal facto não se verificou, pois para 1, 5, 10, 50 e 100 mM, os tamanhos foram de 32,7 nm, 42,9 nm, 30,2 nm, 20,9 nm e 70,1 nm, respectivamente.

Por fim, em relação à **Figura 4.18**, verifica-se que para os papéis que contêm as concentrações da mistura reaccional, consistindo esta em acetato de zinco, para 1 e 5 mM não se verificam outros picos para além dos picos da celulose já verificados nos difractogramas anteriores.

A partir do papel com 10 mM verifica-se um pico a $12,4^\circ$, correspondendo ao acetato de zinco di-hidratado, e para o papel contendo 50 mM identificam-se os picos para o mesmo composto, para $12,4^\circ$, $19,0^\circ$, $20,0^\circ$, $22,3^\circ$, $25,1^\circ$, $27,4^\circ$ e $28,2^\circ$, cujos planos cristalográficos são, respectivamente, o (200), (002), (-111), (202), (310), (311), e (-312).

No caso do papel com 100 mM, identificaram-se os picos do acetato de zinco a $11,2^\circ$, $19,6^\circ$, $22,5^\circ$, $25,2^\circ$ e $30,3^\circ$, correspondendo aos planos (110), (112), (220), (310) e (213).

Estas identificações foram feitas através da ficha de referência para o acetato de zinco hidratado 00-033-1464 e através da ficha de referência do acetato de zinco 00-033-1464.

Assim, comparando-se os três papéis (sem esterilização, com esterilização por autoclave e por radiação UV, constata-se que só se conseguiram obter as np's de ZnO no caso dos papéis esterilizados pela autoclave, e a explicação pode estar relacionada com o facto de as altas temperaturas e pressões características deste meio de esterilização, o que já possa permitir uma explicação para o caso das np's de ZnO não se terem formado no papel sem esterilização: a temperatura da síntese utilizada pode não ter sido suficiente.

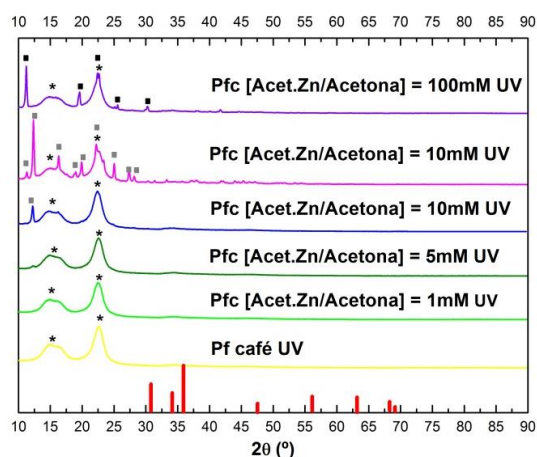


Figura 4.18. Difractograma do papel filtro de café sem nada e com os papéis impregnados com as diferentes concentrações da mistura reaccional, esterilizados por radiação UV, onde os **asteriscos (*)** representam os picos relativos à celulose do tipo I, **os quadrados pretos** os picos referentes ao acetato de Zinco e **os quadrados cinzentos** os picos do acetato de zinco di-hidratado.

Caracterização térmica

■ Termogravimetria

Na **Figura 4.19**, tem-se a análise termogravimétrica dos papéis contendo a mistura reaccional [Acetato de Zinco/Acetona], para as concentrações de 1, 5, 10 e 100 mM.

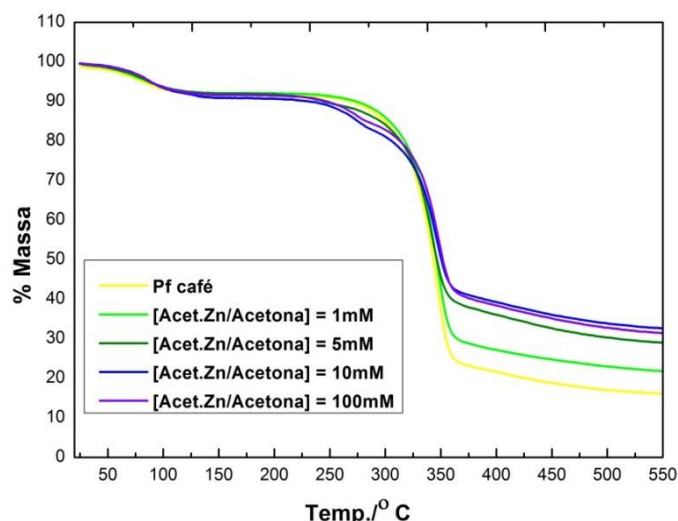


Figura 4.19. Análise termogravimétrica para os vários papéis contendo a mistura reaccional de acetato de zinco em acetona.

Para a gama de temperaturas entre 70 e 100 °C, verifica-se uma pequena perda de massa, comum a todos os papéis, que nada mais é do que a evaporação de água. Já para temperaturas superiores, entre 250 e 350 °C, ocorre também uma segunda perda de massa, mas desta vez em maior percentagem, uma vez que é a degradação da celulose, o componente principal do papel.

Tomando como referência o papel de filtro de café sem nada, constata-se que até ao papel que contém a concentração de 5 mM, a massa residual é proporcional à concentração presente no papel.

Contudo, no que diz respeito aos papéis com as concentrações de 10 e 100 mM, tal não acontece, pois a percentagem de massa residual para o papel mais concentrado na mistura reaccional é inferior à percentagem de massa para o papel com concentração de 10 mM (32,51 para 31,30 %).

Uma possível explicação para a não proporcionalidade da concentração versus a massa residual para estes dois últimos papéis pode ser o facto de o substrato de papel ser o papel de filtro de café, não sendo submetido a controlos de qualidade para averiguar a gramagem em cada filtro.

4.2.3. Caracterização do papel funcionalizado com nanopartículas de prata e óxido de zinco

Caracterização Morfológica

■ Microscopia Electrónica de Varrimento

Na **Figura 4.20** ilustram-se as imagens obtidas pela microscopia electrónica de varrimento, para os papéis de filtro de café, onde foi realizada a síntese *“in situ”* de np'sAg, seguida da síntese de np'sZnO, cujos precursores, nitrato de prata e acetato de zinco di-hidratado, continham a concentração de 10mM. A nomenclatura das figuras (**A**, **B**, e **C**) distingue o papel sem esterilização (**A**), do papel autoclavado (**B**) e papel esterilizado por radiação UV (**C**).

De uma maneira geral, comparando-se os três papéis verifica-se que a quantidade de np's presentes nos papéis esterilizados é superior, nomeadamente no papel esterilizado por radiação UV.

Na imagem **A1**, apenas se verificam as fibras de celulose, enquanto que para uma escala menor (**A2**), já se vêem np's esféricas, algumas mantendo-se dispersas e outras num estado agregado.

Os tamanhos destas passam por 38, 50, 63 e 64 nm.

No que diz respeito às imagens do papel autoclavado (**B1 e B2**), nas fibras celulósicas já se observam micro e nanopartículas, cujas geometrias são bastante distintas, observando-se simultaneamente np's esféricas e aglomerados de partículas de forma irregular que se assemelham às np's de ZnO comerciais observadas, na mesma matriz celulósica, por Soares, 2013. Na imagem **B2** apenas se observam np's esféricas. Para além das np's, é possível constatar que o papel se encontra mais frágil, uma vez que a autoclavagem é um processo um tanto abrasivo, dadas as altas temperaturas e pressões.

Por fim, no papel esterilizado por radiação UV, as np's observadas apresentam, na sua maioria, uma estrutura quadrada (**C1**); no entanto, consegue-se identificar uma estrutura que é muito similar às estruturas de np's de ZnO obtidas para os autores ("joe-1-1-5.pdf," n.d.)

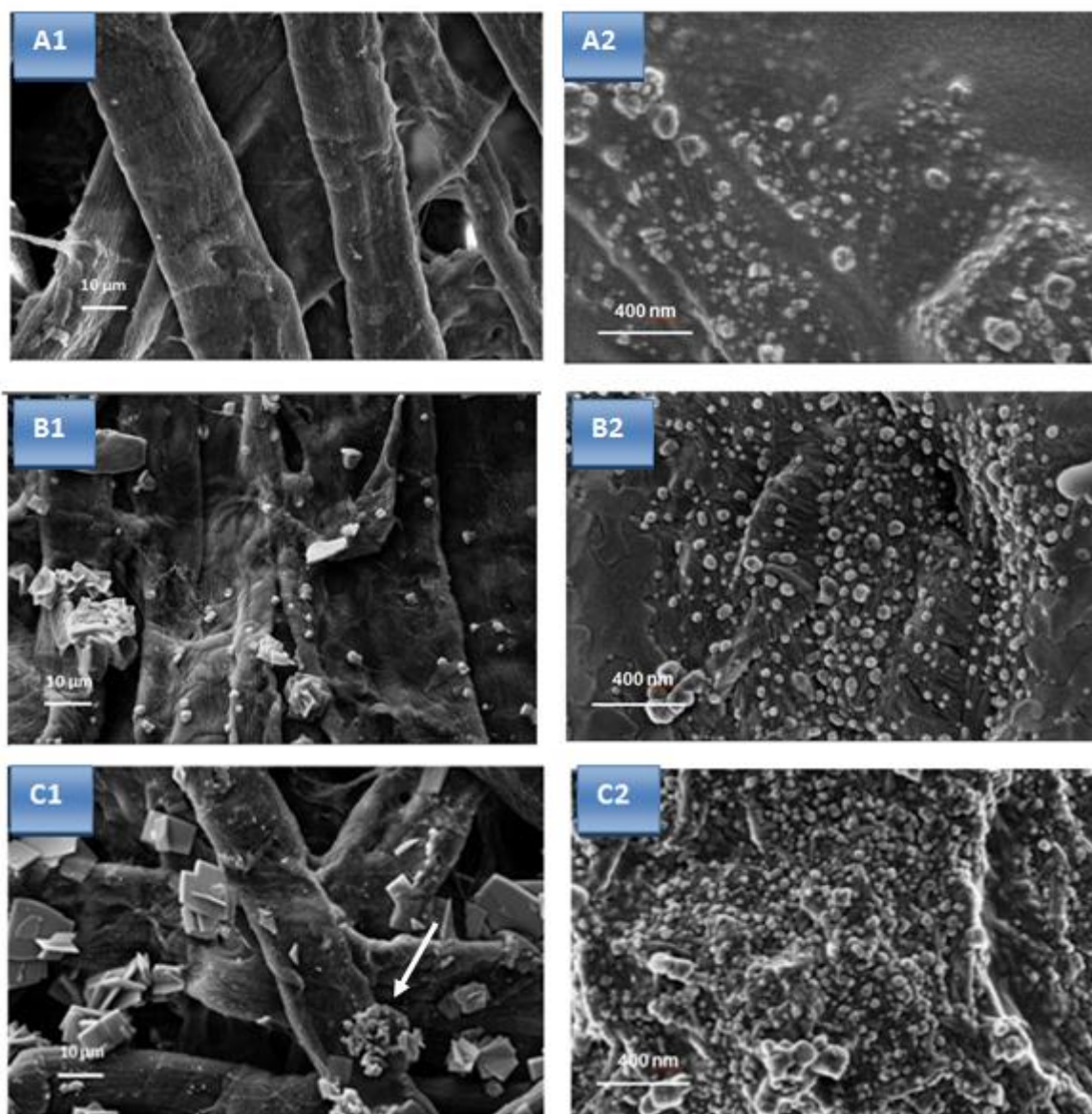


Figura 4.20. Imagens SEM para **A)** papel de filtro de café com np'sAg e acetato de zinco sem esterelização ; **B)** papel de filtro de café com np'sAg/ZnO autoclavado e **C)** papel de filtro de café com np's Ag e acetato de zinco esterelizado com radiação UV.

Caracterização Estrutural

■ Difracção de Raios-X

Na **Figura 4.21**, têm-se os difractogramas obtidos para os três papéis, em que estão dispostas as barras no fundo da imagem que representam os picos típicos para o ZnO (a vermelho) e para a prata (a preto), através das fichas de referência 00-036-1451 e 00-004-0783, respectivamente.

Comum aos três papeis têm-se os dois picos típicos da celulose do tipo I, a $16,4^\circ$ e $22,6^\circ$, correspondendo aos planos cristalográficos (101) e (002).

Para além destes dois picos, a papel esterilizado por radiação UV (linha laranja) apenas apresenta o pico correspondente à intensidade máxima da prata, para um $2\theta = 38,1^\circ$. Em relação aos picos do ZnO, estes só foram identificados no papel autoclavado (linha verde escura), cuja explicação reside no facto de com a autoclavagem se atingirem maiores temperaturas e pressões. Para além destes, também se identificaram os picos para a prata. Por fim, no papel sem esterilização ocorreram picos que não correspondem aos picos de prata e óxido de zinco, mas sim correspondentes aos picos de acetato de zinco.

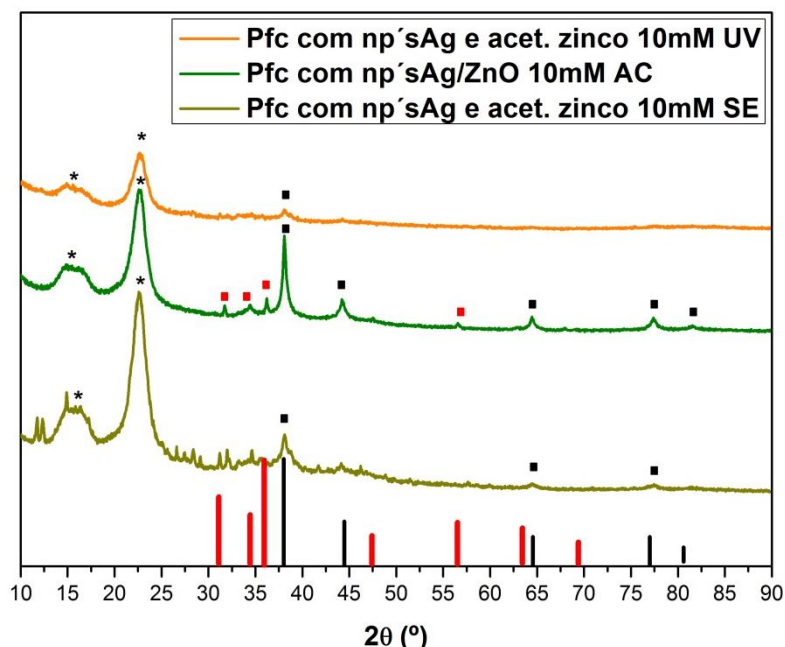


Figura 4.21. Difractogramas para os três papéis onde se fez a síntese de np'sAg via citrato, "in situ", seguida da síntese de np'sZnO. Em baixo, as barras vermelhas correspondem aos picos do ZnO, enquanto que as barras pretas correspondem aos picos característicos da prata; os asteriscos correspondem aos picos característicos da celulose do tipo I.

Caracterização Elementar

■ Espectroscopia Dispersiva de Raios-X

A espectroscopia Dispersiva de Raios-X fornece uma análise química elementar das amostras em estudo. É uma ferramenta do SEM que utiliza o feixe de electrões para excitar a amostra, levando à produção de radiação secundária específica e característica do elemento, e portanto, neste sentido, nas **Figuras 4.22, 4.23, e 4.24** ilustram-se os espectros obtidos de cada um dos três papéis com np's de Ag e acetato de zinco, sem esterilização e com esterilização por radiação UV (**Figuras 4.22 e 4.24**) e np'sAg e ZnO (**Figura 4.23**), esterilizados por autoclave que foram analisados através da energia de radiação secundária emitida pelos elementos.

Em relação à **Figura 4.22**, vê-se que o foco da imagem para análise foi a fibra de celulose, verificando-se no espectro um pico para o átomo de carbono com uma energia de 0,1 keV, e o pico posterior correspondente ao átomo de oxigénio, com uma energia de 0,3 keV. A presença destes dois elementos já era esperada, dada a constituição da celulose, um polissacarídeo, conter carbono e oxigénio. Através da tabela **Tabela 4.1**, pode-se visualizar que é para estes elementos que se obtém maiores percentagens mássicas e atómicas.

Para além destes, foram também identificados átomos de zinco e prata, decorrentes das sínteses efectuadas no papel, sendo a percentagem de zinco inferior à da prata.

Já na **Figura 4.23**, a análise direccionou-se para a estrutura agregada de forma irregular já visualizada na imagem **B1** da **Figura 4.20**, em que através do espectro se pode identificar que o pico mais intenso ocorre para o átomo de zinco, com uma energia de 1,06 keV, e, observando a **Tabela 4.2**, constata-se que a proporção mássica entre os elementos de zinco e prata é similar, contudo, a proporção atómica

do zinco é o dobro. Dado que através da análise de difração de raios x se identificaram os picos de óxido de zinco, assim como os picos da prata, deduz-se que esta estrutura seja, portanto, uma mistura do óxido de zinco com a prata, resultanto, portanto, nesta morfologia indefinida e irregular.

Por fim, o espectro de EDS correspondente ao papel com $np'sAg$ e acetato de zinco que foi esterilizado por luz ultravioleta (**Figura 4.24**) mostra uma maior percentagem de átomos de prata, o que é evidenciado não só pela alta intensidade correspondente ao pico da prata mas também é constatado pela observação da **Tabela 4.3**, atendendo á proporção mássica e atômica de 83,57 e 47,53 %, respectivamente, o que indica que as partículas quadradas observadas eram maioritariamente constituídas por prata.

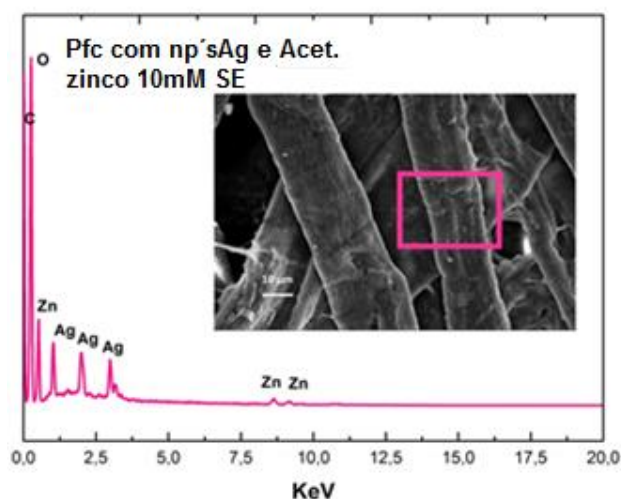


Figura 4.22. Espectro de EDS para o papel de filtro de café com $np'sAg$ e acetato de zinco sem esterilização.

Tabela 4.1. Percentagens Mássica e atômica dos elementos presentes espectro de EDS.

Elemento	% Mássica	% Atômica
C	53,47	69,30
O	28,05	27,30
Zn	7,78	1,85
Ag	10,70	1,54

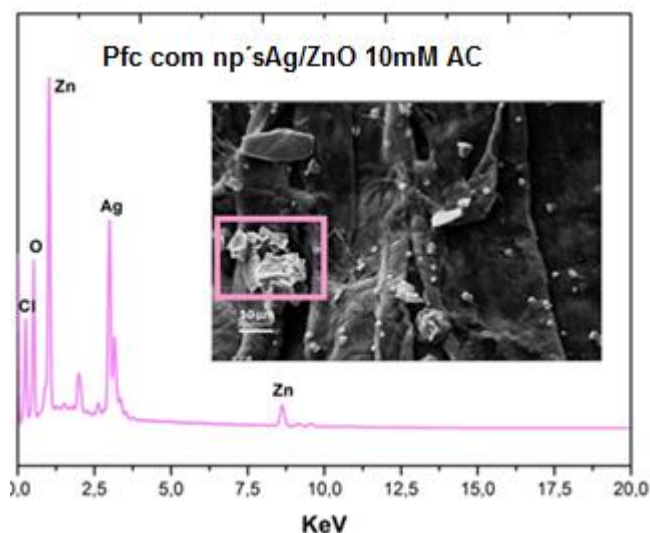


Figura 4.23. Espectro de EDS para o papel de filtro de café com Ag/ZnO com esterilizado por autoclave.

Tabela 4.2. Percentagens Mássica e Atômica dos elementos presentes no espectro de EDS.

Elemento	% Mássica	% Atômica
O	28,74	67,14
Cl	0,33	0,35
Zn	35,21	20,13
Ag	35,73	12,38

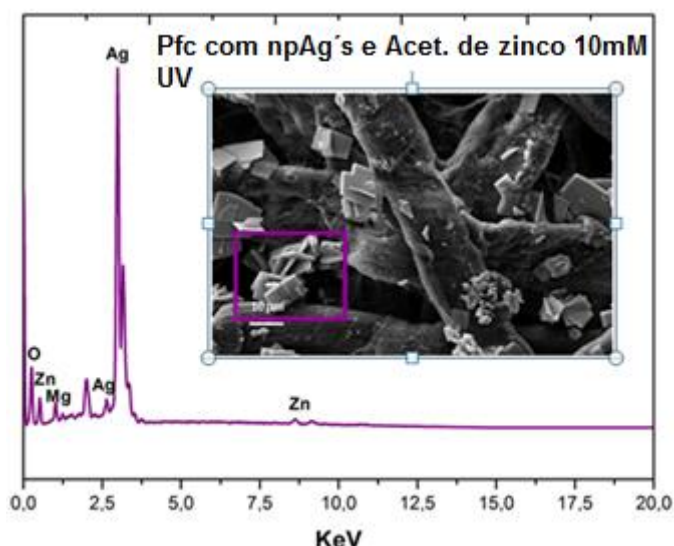


Tabela 4.3. Percentagens Mássica e Atômica dos elementos presentes no espectro de EDS.

Elemento	% Mássica	% Atômica
O	12,67	48,57
Mg	0,23	0,59
Zn	3,53	3,31
Ag	83,57	47,53

Figura 4.24. Espectro de EDS para o papel de filtro de café com np'sAg e acetato de zinco com esterilização uv.

4.2.4. Caracterização do papel funcionalizado com np's comerciais

A caracterização dos papéis funcionalizados com as nanopartículas estruturais foi feita em termos morfológicos, pela microscopia electrónica de varrimento, estruturais, através da técnica de difracção de raios-x, e ópticos, no pela Espectroscopia de Uv-Visível, contudo, os resultados respeitantes a esta técnica não irão ser apresentados.

Tal como foi descrito na secção 2.1.4., a funcionalização destas np's no papel deu-se pela impregnação do papel de filtro de café nas suspensões de 100 mM previamente preparadas através dos pós comerciais das nanopartículas.

Caracterização Morfológica

■ Microscopia Electrónica de Varrimento

Através das **figuras 4.25, 4.26 e 4.27** têm-se as imagens obtidas pela microscopia electrónica de varrimento sendo possível verificar as morfologias das np's de óxido de zinco, óxido de tungsténio e cobre presentes no papel de filtro de café por impregnação deste em suspensões de pós comerciais destas nanopartículas, contendo cada uma das suspensões uma concentração de 100 mM.

No que diz respeito às np's de ZnO comerciais, por observação da **Figura 4.25**, verifica-se que estas se encontram sob uma forma irregular de aglomerados, cujos tamanhos rondam os 200 nm. Atendendo às informações do fabricante, estas np's possuem um tamanho de 14 nm, no entanto, uma vez que a concentração da suspensão tinha uma concentração elevada (100 mM) e não possuía qualquer tipo de estabilizante, estas agregaram e aumentaram de tamanho, o que justifica estas diferenças.

Em relação às np'SWO₃ comerciais, (**Figura 4.26**) estas já se apresentam com uma forma esférica, encontrando-se bem dispersas nas fibras celulósicas, apresentando tamanhos de 70 a 100 nm.

Por fim, na **Figura 4.27**, têm-se as np'sCu comerciais, que praticamente não se veem no papel de filtro de café, apresentando tamanhos de cerca de 200 nm, muito acima do tamanho indicado pelo fabricante, que mencionou um tamanho entre 40 e 60 nm.

O aumento de tamanho destas np's poderá eventualmente estar relacionado com a alta concentração da suspensão, assim como uma fraca estabilidade desta. Por outro lado, a causa de não se observarem muitas np's no papel poderá estar relacionado com uma má homogeneidade da suspensão.

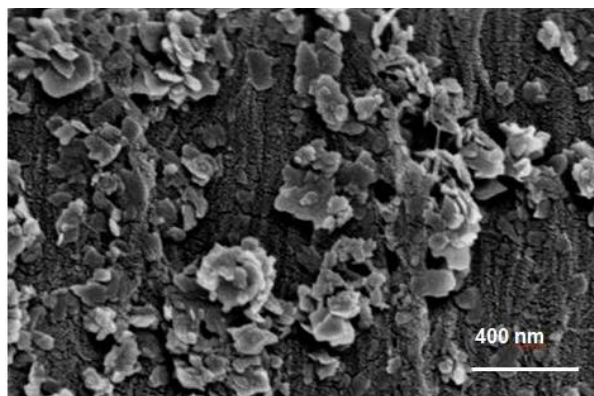


Figura 4.25. Papel de filtro de café impregnado numa suspensão de 100nm np'sZnO comerciais.

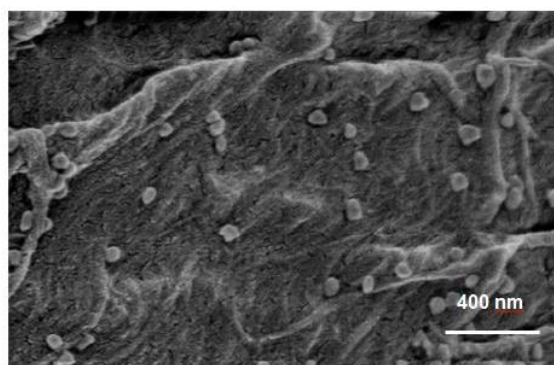


Figura 4.26. Papel de filtro de café impregnado numa suspensão de 100 mM np'SWO₃ comerciais.

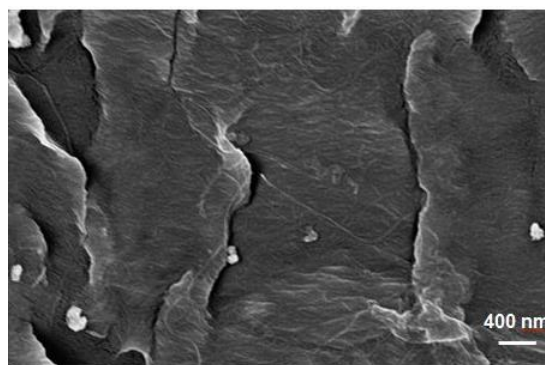


Figura 4.27. Papel de filtro de café impregnado numa suspensão de 100 mM np'SCu comerciais.

Caracterização Estrutural

■ Difração de raios-X

Nas figuras 4.28, 4.29 e 4.30, apresentam-se os difractogramas obtidos para os pós das np's comerciais e também para os papéis impregnados com as as suspensões destas, para as np'sZnO, np's de WO₃ e np'sCu, respectivamente.

As medições foram feitas para ângulos 2θ entre 25 e 80 °.

Na **Figura 4.28**, têm-se os difractogramas obtidos para o pó comercial das np's de ZnO, para o papel de filtro contendo a suspensão destas, e para uma suspensão comercial de ZnO.

Os picos mais intensos observados foram para a suspensão comercial, no entanto, por falta de informação do fornecedor não se sabe que outro tipo de aditivos é que a suspensão poderá ter e nesse sentido, apenas se atendeu aos resultados envolvendo o pó comercial e do papel impregnado, identificando-se, como era esperado, os picos típicos característicos para o ZnO através da ficha de referência para o óxido de zinco 00-036-451, correspondendo a uma estrutura cristalina hexagonal, com o grupo espacial P6₃mc.

Na **Figura 4.29**, também foi possível identificar os picos característicos do óxido de tungsténio, verificando-se a coincidência dos picos do pó comercial com os picos do WO₃ para o papel impregnado com a suspensão deste, sendo os picos identificados de acordo com a ficha de referência para o óxido de tungsténio, 00-043-1035, possuindo uma estrutura cristalina monoclinica.

Por fim, nos difractogramas relativos às np'sCu, na **Figura 4.30**, para os ângulos $2\theta = 43, 50$ e 74° identificam-se os três picos mais intensos descritos na ficha de referência para o cobre 00-004-0836,

sendo mais intensos no pó comercial do que no papel que foi impregnado na suspensão, o que vai de acordo com o observado na **Figura 4.27**, a pouca quantidade de np'sCu presentes no papel de filtro de café.

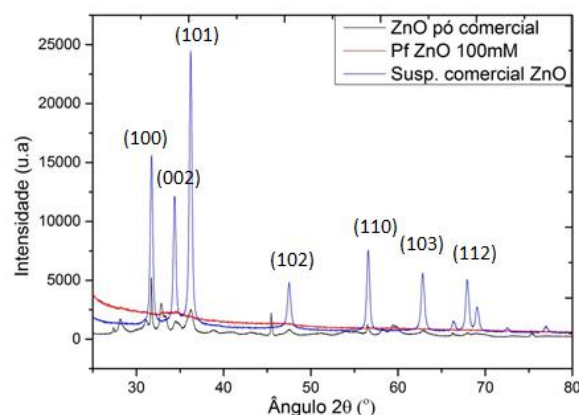


Figura 4.28. Difractogramas obtidos para o pó de np'sZnO comerciais, para o papel de filtro de café impregnado na suspensão das np'sZnO e para a suspensão comercial.

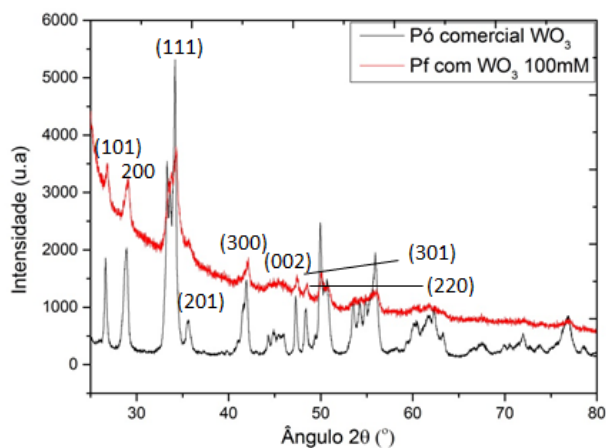


Figura 4.29. Difractogramas obtidos para o pó de np'SWO₃ comerciais, para o papel de filtro de café impregnado na suspensão das np'SWO₃.

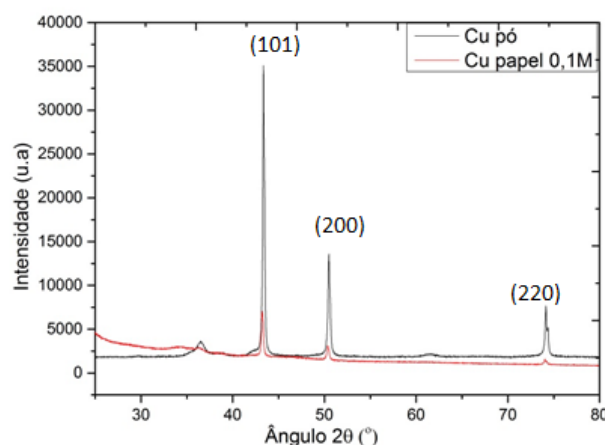


Figura 4.30. Difractogramas obtidos para o pó de np'SCu comerciais, para o papel de filtro de café impregnado na suspensão das np'SCu.

4.3. Estudo da actividade anti-bacteriana dos papéis funcionalizados com as nanopartículas

Para avaliar a actividade anti-bacteriana dos papéis funcionalizados com as np's foram feitos testes anti-bacterianos com as estirpes *E.coli* ATCC25922 e *S.aureus* ATCC25923.

Os testes anti-bacterianos foram realizados pelo método de Kirby-Bauer, sendo um teste baseado na difusão do agar.

De modo a garantir que a actividade anti-bacteriana provém das np's sintetizadas, fizeram-se controlos negativos, nomeadamente com o papel de filtro de café (**Tabela 4.4.**)

Tabela 4.4. Demonstração dos testes anti-bacterianos realizados para o papel de filtro de café

Material	Controlo negativo <i>S.aureus</i>	Controlo negativo <i>E.coli</i>
Papel de filtro de café		

4.3.1. Estudo da actividade anti-bacteriana dos papéis funcionalizados com as nanopartículas de prata

De seguida ilustram-se os resultados dos testes anti-bacterianos efectuados para os papéis que contêm as np'sAg, cujo foco de análise vai ser a formação do halo de inibição, o qual indica existência de actividade anti-bacteriana.

Não obstante, verificar-se-à também através dos testes efectuados de que modo o halo formado varia (aumenta ou diminui) em função dos parâmetros que se fizeram variar, tais como tipo de síntese, tipo de agente redutor usado, concentração e/ou tempo de impregnação dos papéis na suspensão de np'sAg.

Para além dos controlos negativos que se fizeram inicialmente (papel de filtro de café sem nada), efectuaram-se outros, de forma a garantir se o efeito anti-bacteriano das nanopartículas de prata era efectivamente devido a estas e não devido aos agentes redutores utilizados, impregnou-se o papel de filtro de café numa suspensão de nitrato de potássio e citrato de sódio e noutra suspensão de nitrato de potássio com borohidreto de sódio.

⇒ Metodologia “In situ”

Na **Figura 4.31** tem-se a representação gráfica da média do diâmetro do halo de inibição em função da concentração para a metodologia “in situ”, via citrato de sódio (**Fig.4.31 à esq.**) e via borohidreto de sódio (**Fig.4.31 à dir.**) Uma vez que o diâmetro do papel de filtro de café é de 6 mm, a observação deste valor no gráfico corresponde a uma não actividade anti-bacteriana. Através da **Figura 4.31**, na metodologia que usa o citrato de sódio como agente de redução da prata (**à esq.**) vê-se que para a concentração de 1mM a média do diâmetro do halo para os ensaios é de 6, 25 mm, para ambas as estirpes; tal facto também é passível de ser observado para a metodologia que usa o borohidreto de sódio, (**à dir.**) constatando-se que para baixas concentrações de np'sAg no papel o efeito anti-bacteriano é praticamente nulo. Aumentando a concentração para 10 mM, e comparando as duas sínteses com diferentes redutores, constata-se que a média dos halos atinge um maior valor para a síntese com o citrato de sódio, e, em particular, para a estirpe *S.aureus* ATCC25923, enquanto que na síntese com o borohidreto de sódio o pequeno aumento dos halos deu-se para a *E.c.* ATCC25922. Segundo a literatura, e atendendo aos testes realizados com estas bactérias, a *E.coli* surge como sendo a bactéria mais susceptível à actividade anti-bacteriana das np'sAg do que a *S. aureus*; (Kim et al., 2007) O principal motivo reside no facto de esta ser uma bactéria gram-negativa, apresentando diferenças estruturais, nomeadamente a nível da parede celular, que lhe conferem uma maior fragilidade e facilidade de penetração comparativamente com a *S.aureus*, que é uma bactéria Gram-positiva e cuja parede celular possui uma espessa camada de peptidoglicano (cerca de 30 nm) face aos 2-3 nm da camada da parede celular das bactérias Gram-negativas.

Com isto, constata-se a importância da estrutura da parede celular, no entanto, não só, pois factores como forma, cristalinidade, estabilidade, tamanho, entre outros também exercem influência na eficácia anti-bacteriana das np'sAg.

Em particular, o tamanho tem sido mencionado como um factor muito influente na actividade anti-bacteriana das np'sAg.

Não obstante, autores Li *et al.*, (2008) evidenciaram o facto de as np'sAg possuírem um tamanho de 10 nm as torna mais tóxicas, nomeadamente para *E.coli*. Tal poderá justificar a actividade anti-bacteriana verificada para o papel onde foi efectuada a síntese “*in situ*” via borohidreto de sódio, uma vez que este redutor forma np's mais pequenas que o citrato de sódio, tendo sido possível constatar a presença de agnp's que rondavam os 10nm nas imagens SEM.

Na **tabela 4.5** ilustram-se os halos de inibição para os papéis onde foi realizada a síntese de npAg's “*in situ*” via citrato, para $[AgNO_3]$ de 1 e 10 mM.

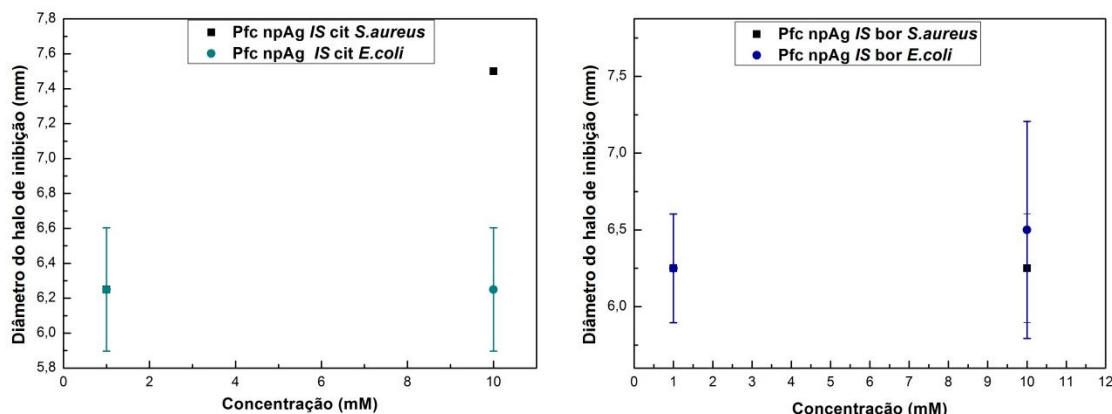


Figura 4.31. Representação gráfica do diâmetro do halo de inibição em função da concentração para a metodologia “*in situ*”, via citrato de sódio (esq.) e via borohidreto de sódio (dir.)

Tabela 4.5. Ilustração do resultado dos testes anti-bacterianos realizados com os papéis onde foi realizada a síntese de np'sAg “*in situ*”, via citrato de sódio.

Tabela 4.6. Ilustração do resultado dos testes anti-bacterianos realizados com os papéis onde foi realizada a síntese de np'sAg “*in situ*”, via borohidreto de sódio.

Material	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
Controlo Negativo		
Pfc com np'sAg via cit. In situ com $[AgNO_3] = 1mM$		
Pfc com np'sAg via cit. In situ com $[AgNO_3] = 10 mM$		

Material	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
Controlo Negativo		
Pfc com np'sAg via bor. In situ com $[AgNO_3] = 1mM$		
Pfc com np'sAg via bor. In situ com $[AgNO_3] = 10mM$		

Dado que os resultados com os papéis de filtro de café contendo as np's de prata via citrato “*in situ*” foram satisfatórios, fizeram-se testes anti-bacterianos sujeitando os papéis à esterilização por autoclave e por radiação UV.

Os resultados estão representados na **Tabela 4.7.** e, por comparação com a **Figura 4.31**, á esquerda, atendendo ao papel com a maior concentração, 10 mM, conclui-se que com a autoclavagem o diâmetro dos halos de inibição diminuiu, sendo essa diferença mais acentuada para *E.coli*, obtendo-se os melhores resultados quando os papéis foram esterilizados por radiação UV.

Tabela 4.7. Representação do diâmetro do halo de inibição em função da concentração para o papel de filtro de café com metodologia “*in situ*”, via citrato de sódio com esterilização por autoclave e por radiação UV.

	<i>E.coli</i> ATCC25922		<i>S.aureus</i> ATCC25923	
Pf 10mM np ^s Ag com [AgNO ₃] = 10mM cit is	AC	UV	AC	UV
	6	6,5	6,2	8

⇒ Metodologia com impregnação

Na **Figura 4.32.** e nas **Tabelas 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11** ilustram-se os resultados obtidos para os testes anti-bacterianos dos papéis impregnados na suspensão de np^sAg com diferentes sínteses, concentrações e por diferentes tempos de impregnação.

Dos resultados obtidos para os papéis impregnados na suspensão de np^sAg via citrato de sódio, apenas os papéis impregnados com a suspensão mais concentrada (10 mM) exibiram actividade anti-bacteriana, em que o diâmetro médio dos halos formados se situou acima de 8mm, verificando-se uma relação de proporcionalidade directa entre o diâmetro destes e o tempo de impregnação, para a bactéria *S.a. ATCC25923*. Já no caso da *E.c. ATCC25922* e por comparação com os resultados com a bactéria *S.a. ATCC25923*, o diâmetro médio do halo foi um pouco mais baixo, tendência essa verificada na metodologia “*in situ*”; contudo, não existiu uma relação de proporcionalidade directa com o tempo de impregnação (**Figura 4.32 à esq.**).

Nas **Tabelas 4.8 e 4.10** podem-se visualizar os diâmetros dos halos formados para os papéis impregnados com a suspensão de np^sAg via citrato.

Relativamente aos papéis impregnados com a suspensão de np^sAg via borohidreto de sódio, (**Figura 4.32 à dir.**) verifica-se que estes não mostraram actividade anti-bacteriana. A ausência dos halos de inibição pode ser comprovada pela observação das **Tabelas 4.9 e 4.11**.

Dentre as teorias existentes na literatura com vista a explicar o mecanismo de actuação das np^sAg, um deles refere-se á libertação dos iões de prata, em que estes atacam grupos funcionais das proteínas presentes nas membranas das bactérias e cuja afinidade é elevada para estes, pois são grupos com carga negativa, tal como o grupo tiol. Assim, como as np^sAg têm carga positiva, promove-se a ligação destes o que vai afectar a permeabilidade da membrana, permitindo a entrada dos iões de prata, sendo bastante tóxicos para esta. (Guzmán et al., 2009)(Pati et al., 2014) (Ghule et al., 2006))(Hajipour et al., 2012)

Assim, uma vez que se só se obtiveram actividades anti-bacterianas significativas para ambas as estirpes bacterianas com ambas metodologias via citrato de sódio, para os papeis com a maior concentração, conclui-se que este foi melhor agente redutor que o borohidreto de sódio, e que partindo de uma concentração de 10 mM de nitrato de prata os papéis já demonstram uma actividade anti-bacteriana considerável para ambas as estirpes.

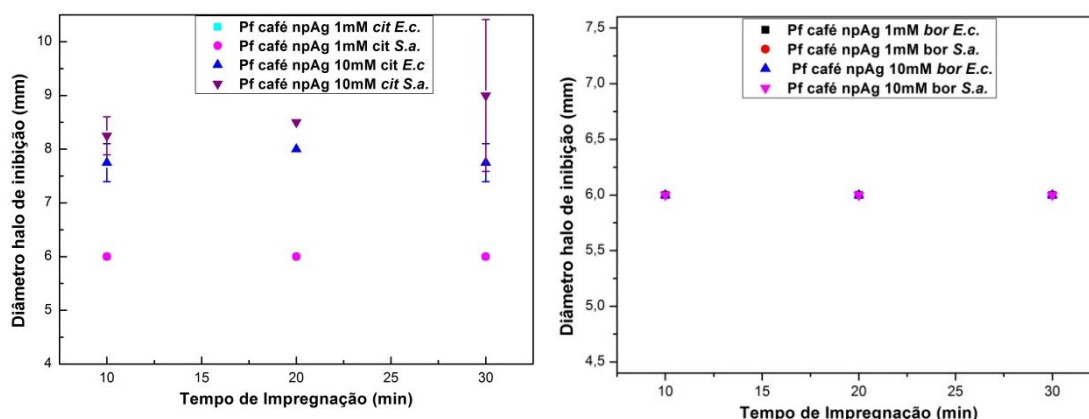


Figura 4.32. Representação gráfica do diâmetro do halo de inibição em função do tempo de impregnação do papel na suspensão de np^sAg, via citrato de sódio (**esq.**) e via borohidreto de sódio (**dir.**)

Tabela 4.8. Testes anti-bacterianos realizados com os papéis impregnados na suspensão de npAg com $[AgNO_3] = 1 \text{ mM}$ via citrato de sódio.



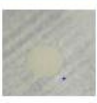





Material	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
Controlo negativo		
Pf café impregnado com a suspensão de npAg's 1mM via cit por 10 min		
Pf café impregnado com a suspensão de npAg's 1mM via cit por 20 min		
Pf café impregnado com a suspensão de npAg's 1mM via cit por 30 min		

Tabela 4.9. Testes anti-bacterianos realizados com os papéis impregnados na suspensão de npAg com $[AgNO_3] = 1 \text{ mM}$ via borohidreto de sódio.









Material	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
Controlo negativo		
Pf café impregnado com a suspensão de npAg's 1mM via bor. por 10 min		
Pf café impregnado com a suspensão de npAg's 1mM bor. por 20 min		
Pf café impregnado com a suspensão de npAg's 1mM via bor. por 30 min		

Tabela 4.10 Testes anti-bacterianos realizados com os papéis impregnados na suspensão de npAg com $[AgNO_3] = 10 \text{ mM}$ via citrato de sódio.


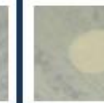













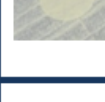
Material	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
Controlo negativo		
Pf café impregnado com a suspensão de npAg's 10mM via cit. por 10 min		
Pf café impregnado com a suspensão de npAg's 10mM via cit. por 20 min		
Pf café impregnado com a suspensão de npAg's 10mM via cit. por 30 min		

Tabela 4.11. Testes anti-bacterianos realizados com os papéis impregnados na suspensão de npAg com $[AgNO_3] = 10 \text{ mM}$ via borohidreto de sódio.

Material	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
Controlo negativo		
Pf café impregnado com a suspensão de npAg's 10mM via bor. por 10 min		
Pf café impregnado com a suspensão de npAg's 10mM via bor. por 20 min		
Pf café impregnado com a suspensão de npAg's 10mM via bor. por 30 min		

4.3.2. Estudo da actividade anti-bacteriana dos papéis funcionalizados com as np's de óxido de Zinco

À semelhança do que se fez para as np'sAg, realizaram-se controlos negativos, substituindo-se o acetato de zinco usado na síntese por acetato de cálcio. De seguida, mostram-se os resultados dos testes anti-bacterianos para os papéis onde foi realizada a síntese (*in situ*) com a finalidade de se obter as np'sZnO resultantes da mistura reaccional de [Acetato de Zinco/Acetona], que, como já foi mencionado numa das técnicas de caracterização estrutural, estas só se conseguiram obter nos papéis que foram esterilizados pela autoclave. Assim irá-se avaliar a actividade destes papéis em termos de concentração (1, 5, 10, 50 e 100mM), de esterilização (por autoclave e radiação UV) podendo-se também correlacionar a eficácia da actividade antibacteriana em termos de np's de óxido de zinco e sais de zinco.













■ Papéis com a mistura reaccional [Acetato Zn/Acetona] sem esterelização

Por observação da **Figura 4.33**, que representa as médias dos halos de inibição em função da concentração da mistura reaccional de acetato de zinco em acetona no papel, verifica-se que para a concentração mais baixa (1 mM), não existe efeito anti-bacteriano para ambas as estirpes bacterianas, assim como também não se verifica uma relação de proporcionalidade directa entre o diâmetro do halo versus aumento da concentração.

Comparando os valores obtidos para os diâmetros dos halos para as duas bactérias, a partir de 5 mM, observa-se que a actividade anti-bacteriana é superior para *S.a ATCC25923*, facto esse que vai de encontro com a literatura (Azam, 2012)(Premanathan, Karthikeyan, Jeyasubramanian, & Manivannan, 2011) (Singh, Joyce, Beddow, & Mason, 2012)(Yamamoto, 2001). Assim, face aos resultados obtidos, e uma vez que não se obtiveram as np'sZnO no papel, acredita-se que o efeito anti-bacteriano observado se tenha devido aos iões de zinco.

Na **Tabela 4.12** ilustram-se os resultados decorrentes dos testes anti-bacterianos para os papéis com as várias concentrações da mistura reaccional de acetato de zinco em acetona.

Tabela 4.12. Resultados dos testes anti-bacterianos para os papéis com as várias concentrações da mistura reaccional de acetato de zinco em acetona

Material	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
Controlo negativo		
Pf [Acet.Zn/Acetona] = 1mM		
Pf [Acet.Zn/Acetona] = 5mM		
Pf [Acet.Zn/Acetona] = 10mM		
Pf [Acet.Zn/Acetona] = 50mM		
Pf [Acet.Zn/Acetona] = 100mM		

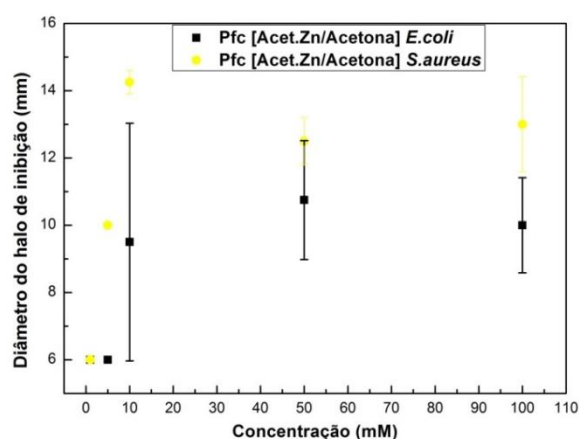


Figura 4.33. Ilustração gráfica dos halos de inibição em função da concentrações de acetato de zinco em acetona, no papel.

■ Papéis com np'sZnO esterilizados por autoclave

No que diz respeito aos papéis submetidos à autoclavagem, nestes, ao invés dos papéis anteriores, efectivamente já se conseguiram obter as np's de ZnO, facto esse confirmado pela identificação de picos característicos do ZnO no difractograma obtido para estes papéis, através da técnica de análise de Difracção de raios-X.

Posto isto, e atendendo ao relevo que tem sido dado às propriedades anti-bacterianas das np'sZnO, seria esperado que os resultados envolvendo estes papéis fossem superiores aos papéis anteriores, o que não se verificou, pois, por comparação com a **Figura 4.33**, observa-se que os diâmetros dos halos são inferiores.

Para os papéis com a concentração de np'sZnO de 1 e 100 mM não se verificou actividade anti-bacteriana para ambas as estirpes e para 5 mM o diâmetro do halo formado foi mínimo. No entanto, evidenciaram-se algumas semelhanças com a **Figura 4.33**, nomeadamente em relação ao facto de o diâmetro médio dos halos de inibição também ser maior para *S.a. ATCC25923* o que evidenciou uma maior susceptibilidade desta aos testes envolvendo o zinco, para além também da observação de que a maior actividade anti-bacteriana se tinha dado para o papel com a concentração de 10 mM.

Assim, e à semelhança do que foi mencionado para as np'sAg, constata-se mais uma vez que a concentração tem um papel preponderante na actividade anti-bacteriana das np'sZnO, mas não só, pois factores como a área superficial (quanto maior menor o tamanho da partícula), estrutura cristalina e forma da nanopartícula, entre outros também vão ter a sua influência.

Até à data, vários mecanismos têm sido propostos para explicar o modo de acção das np'sZnO, tais como a libertação de iões de zinco, produção de elevados níveis de espécies reactivas de oxigénio (ERO's), assim como a deposição de np's na superfície da bactéria, ou acumulação destas no citoplasma ou até na região peroplasmática, levando assim à interrupção de funções celulares, causando a disrupção e desorganização da membrana celular (Raghupathi et al., 2011)

No entanto devido à complexidade do mecanismo anti-bacteriano, este ainda não foi totalmente esclarecido.

Posto isto, e atendendo aos resultados obtidos, deduz-se que a actividade anti-bacteriana demonstrada em ambos os papéis tenha sido devida à libertação de iões de zinco, pois uma vez que o efeito foi maior para os papéis que continham o sal de zinco (acetato de zinco) dissolvido em acetona, estes iões, estando na forma de sal e não na forma de nanopartículas, por adição de um solvente orgânico soltam-se mais facilmente.













Tal facto vai de encontro com os autores Cioffi & Mahendra, 2012, que mencionam que a libertação de iões Zn^{2+} numa suspensão contendo o precursor é muito superior à libertação destes através de uma suspensão de np's de ZnO.

Os iões Zn^{2+} já são conhecidos por inibir algumas actividades na bactéria, entre as quais, a glicólise; contudo, ainda não se sabe com clareza de que forma é que podem afectar o crescimento bacteriano. Segundo os autores Khamkure et al., 2013, estes iões apresentam alguns possíveis mecanismos de desinfecção, já que se ligam às membranas dos microorganismos, causam danos às paredes celulares, e inibem certas enzimas necessárias ao bom funcionamento da célula, o que, segundo os mesmos, aliando estas propriedades à sua disponibilidade e toxicidade, especialmente para as bactérias coliformes fecais, o constitui como um bom agente de desinfecção.

Porém, segundo os mesmos autores o efeito destes iões deve-se a uma vertente mais bacteriostática do que bactericida, na medida em que estes, ao ligarem-se à membrana bacteriana, vão inibir a proliferação destas, o que vai prolongar a fase lag, sendo a fase durante a qual as bactérias se adaptam às condições de crescimento. É o período em que estas sofrem maturação não sendo ainda capazes de se dividir, ocorrendo a síntese de ARN (ácido ribonucleico), enzimas e outras moléculas.

Na **Tabela 4.13** ilustram-se os halos formados para os papéis com as np'sZnO formadas com a autoclavagem.

Tabela 4.13. Resultados dos testes anti-bacterianos para os papéis com as várias concentrações e np'sZnO que foram autoclavados

Material	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
Controlo negativo pf AC		
Pfc com [np'sZnO] AC = 1mM		
Pf com [np'sZnO] AC = 5mM		
Pf com [np'sZnO] AC = 10mM		
Pf com [np'sZnO] AC = 50mM		
Pf com [np'sZnO] AC = 100mM		

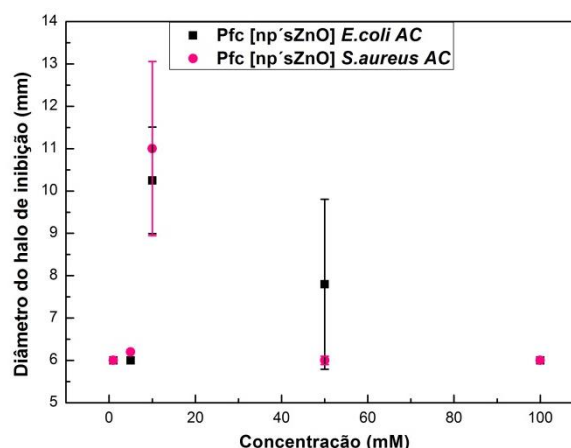


Figura 4.34. Ilustração gráfica dos halos de inibição em função da concentrações de np'sZnO presentes nos papéis que foram autoclavados.

■ Papéis com a mistura reaccional [Acetato Zn/Acetona] esterilizados com radiação UV

Por análise da **Figura 4.35**, que correlaciona os diâmetros dos halos de inibição em função da concentração da mistura reaccional presente nos papéis que depois foram esterilizados por luz ultravioleta, verifica-se que a média dos diâmetros dos halos obtidos foi superior aos resultados ilustrados pelas **Figuras 4.33 e 4.34**, evidenciando-se, à semelhança do que aconteceu para os mesmos, uma actividade anti-bacteriana superior para *S.a ATCC25923*.

Como foi mencionado anteriormente, um dos mecanismos envolvidos na interacção das np'sZnO com as bactérias é a produção de espécies reactivas de oxigénio (ERO's).

Contudo, através do difractograma obtido para estes papéis activados por luz ultravioleta não se identificou ZnO mas sim picos característicos do acetato de zinco di-hidratado, entre outros, o precursor usado na síntese.













Face aos resultados obtidos, e uma vez que a radiação UV nas np'sZnO aumenta a produção de radicais livres, e consequentemente leva a uma melhor actividade anti-bacteriana (Ghule et al., 2006) poderá ter havido fotodissociação do acetato de zinco di-hidratado, em que através de reacções de oxidação-redução e envolvendo radicais, se produziu peróxido de hidrogénio, que é extremamente tóxico para a bactéria e consegue penetrar facilmente na célula (Cioffi & Mahendra, 2012), originando uma melhor actividade anti-bacteriana comparativamente com as actividades anti-bacterianas constatadas nos papéis anteriores.

Por fim, o motivo pela qual a actividade anti-bacteriana foi superior nos três papéis para *S.a. ATCC25923* deve-se a uma maior sensibilidade desta às espécies reactivas de oxigénio e tal facto relaciona-se com a estrutura da bactéria:

Uma vez que a *E.c ATCC25922* é uma bactéria Gram-negativa, acaba por ter uma maior resistência a estas espécies pela sua estrutura ser mais complexa, devido ao facto de possuir uma membrana externa - ao invés da espessa camada de peptidoglicano característica das bactérias Gram-positivas,

que é constituída essencialmente por lipopolissacarídeos, que vão actuar como uma barreira de permeabilidade, de modo a que a absorção de ERO's vai ser minimizada.

Tabela 4.14. Resultados dos testes anti-bacterianos para os papéis com as várias concentrações da mistura reaccional de acetato de zinco em acetona esterelizados por radiação UV.

Material	<i>s.aureus</i>	<i>E.coli</i>
Controlo negativo UV		
Pf [Acet.Zn/Acetona] UV = 1mM		
Pf [Acet.Zn/Acetona] UV = 5mM		
Pf [Acet.Zn/Acetona] UV = 10mM		
Pf [Acet.Zn/Acetona] UV = 50mM		
Pf [Acet.Zn/Acetona] UV = 100mM		

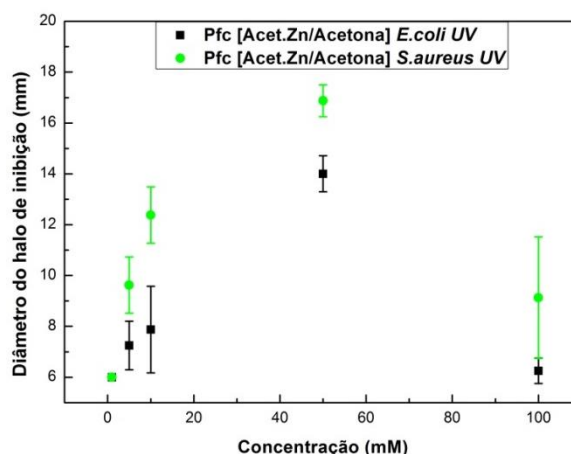


Figura 4.35. Ilustração gráfica dos halos de inibição em função da concentrações de acetato de zinco em acetona presentes nos papéis que foram esterelizados por radiação UV.

Dado que não se conseguiram obter as np's de óxido de zinco para os papéis sem esterilização e com esterilização por radiação UV, fizeram-se testes anti-bacterianos com o acetato de zinco di-hidratado em H₂O, de modo a perceber a contribuição deste sal para o efeito anti-bacteriano dos papéis. Os resultados encontram-se na **Tabela 4.15**, e mostram que o precursor acetato de zinco di-hidratado já possui efeito anti-bacteriano, sendo este significativamente superior quando se submete o papel à radiação UV.

Tabela 4.15. Resultados dos halos de inibição observados para os papéis contendo [Ac.Zinco/H₂O] = 10 mM, sem esterilização, autoclavados e esterilizados por radiação UV.

Suporte: papel de filtro de café	Halo de inibição (mm)	
	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>E.coli</i> ATCC25922
[Ac.Zinco/H ₂ O] = 10mM Sem esterilização	10	8
[Ac.Zinco/H ₂ O] = 10mM Com autoclave	8,5	6,2
[Ac.Zinco/H ₂ O] = 10mM Com UV	11	10

4.3.3. Estudo da actividade anti-bacteriana dos papéis funcionalizados com as np's de prata e óxido de zinco

Ao realizar os testes anti-bacterianos nos papéis onde se realizaram as sínteses com a finalidade de obter as np's de prata e óxido de zinco, pretendeu-se avaliar se a junção destes dois tipos de np's tinham um efeito sinérgico, efeito esse já constatado em estudos realizados por Motshekga et al., 2013 cujos autores mencionam que a junção de um metal com um óxido metálico (e em particular o óxido de zinco com a prata) convida à melhor actividade anti-bacteriana (Koga et al., 2009). Assim, variando parâmetros como a esterilização e o tipo desta, pretende-se avaliar de que modo a actividade anti-bacteriana é afectada, analisando o efeito anti-bacteriano para mais duas bactérias para além das anteriores, a bactéria *E. faecalis* NCTC775 e uma estirpe diferente da *E. c.* ATCC25922: a *E. c.* NCTC9001, mantendo-se a concentração constante para os três papéis (sem esterilização, autoclavados e esterilizados por radiação UV) para 10 mM, isto é, para a síntese das np's de prata usou-se $[AgNO_3] = 10 \text{ mM}$ e posteriormente $[Acetato \text{ de } Zinco/Acetona] = 10 \text{ mM}$.

Face aos resultados obtidos, que estão ilustrados nas Figuras 4.36, 4.37 e 4.38, verifica-se que os maiores halos se deram para o papel que foi esterilizado por radiação UV (Figura 4.38), contudo, os resultados para o papel sem esterilização foram próximos, em que a diferença foi essencialmente no valor dos halos para as bactérias *E. faecalis* NCTC775 e a *E. c.* NCTC900, que foram mais baixos.

Na Figura 4.37, referente ao papel autoclavado, era esperado uma maior actividade anti-bacteriana, pois foi neste papel que através da técnica de difracção de raios-X se identificaram os picos de óxido de zinco, assim como os de prata, esperando-se portanto um sinergismo entre estes, o que não se verificou, mantendo-se a tendência observada tanto no papel com np'sAg via citrato *in situ* com autoclave, como no papel com as np's de ZnO, cujos diâmetros dos halos de inibição quando comparados para os mesmos papéis sem esterilização são inferiores (considerando apenas as bactérias *S. a.* ATCC25923 e *E. c.* ATCC25922), concluindo-se que o processo de autoclavagem não favorece a actividade anti-bacteriana.

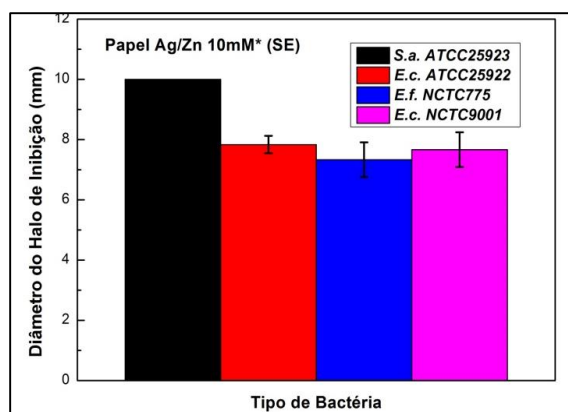


Figura 4.36. Ilustração gráfica dos halos de inibição em função do diâmetro do halo de inibição , formado no papel com np'sAg e acetato de zinco de concentração de 10 mM sem esterilização, para as diferentes bactérias

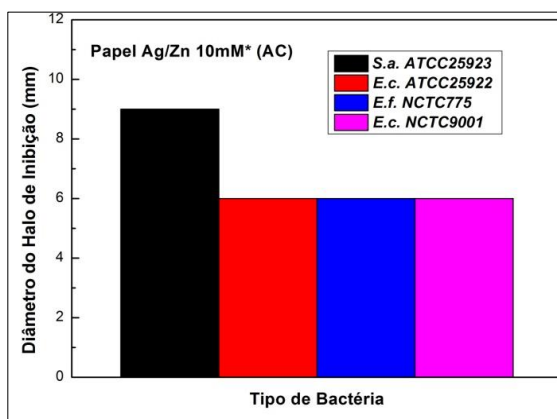


Figura 4.37. Ilustração gráfica dos halos de inibição em função do diâmetro do halo de inibição formado no papel com np'sAg e ZnO, de concentração 10 mM, com esterelização au

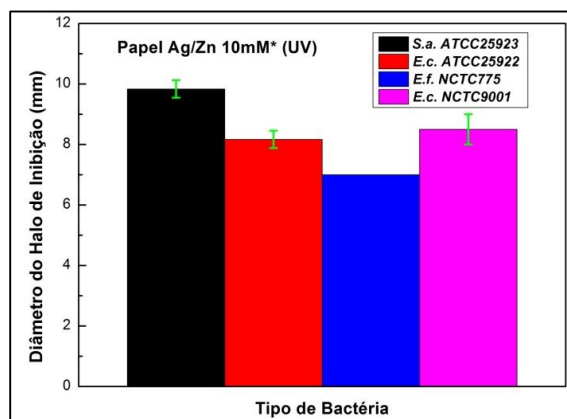


Figura 4.38. Ilustração gráfica dos halos de inibição em função do diâmetro do halo de inibição formado no papel com np'sAg e acetato de zinco, de concentração 10 mM, com esterelização com radiação UV para as diferentes bactérias

4.3.4. Estudo da actividade anti-bacteriana dos papéis funcionalizados com as np's comerciais

À semelhança do que se fez para as np's sintetizadas, a actividade anti-bacteriana do papel de filtro de café contendo as np's comerciais também foi avaliado.

Neste sentido, os resultados decorrentes da realização dos testes anti-bacterianos estão representados na **Tabela 4.16**.

Através da **Tabela 4.16** é possível verificar que nenhum dos papéis funcionalizados com as np's de ZnO, WO₃ e Cu exibiu halos de inibição e portanto não houve actividade anti-bacteriana destes. Especificamente em relação aos resultados obtidos para o papel impregnado com as np'sZnO comerciais, estes estão de acordo com os resultados obtidos para o papel com a mistura reaccional de [Acetato de zinco/Acetona] = 100 mM, que, após a autoclavagem deu origem a np's de óxido de zinco, mostrando que para uma concentração de 100 mm de np's de ZnO não se obtém efeito anti-bacteriano. No que diz respeito às np's de WO₃ e de Cu, a concentração pode ter tido um papel preponderante no caso das primeiras, já que segundo a literatura, quanto maior é o tamanho das np's menor é a actividade anti-bacteriana, e no caso das últimas, as np'sCu, deduz-se que uma má impregnação do papel possa ter influenciado, na medida em que não havendo tantas np's presentes, também não ocorre actividade anti-bacteriana.

Tabela 4.16. Resultados anti-bacterianos para os papéis impregnados com as suspensões de np's comerciais.

Material	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
Papel de filtro de café [np'sZnO] =100mM		
Papel de filtro de café [np'sCu] =100mM		
Papel de filtro de café [np'SWO ₃] =100mM		

Por fim, e com o término da análise para os papéis de filtro de café funcionalizados com os vários tipos de np's, conclui-se que os melhores resultados dos testes anti-bacterianos foram para os papéis contendo a mistura reaccional de acetato de zinco em acetona, que foram depois esterilizados por

radiação UV, e em particular, as concentrações que exibiram os melhores resultados foram as de 10, 50 e 100 mM.

Contudo, como o resultado para o papel contendo Ag e “ZnO” esterilizado por radiação UV, foi satisfatório, optou-se também por testar este papel.

4.4. Prova de Conceito – Validação Experimental

Atendendo à aplicação a que se propõe o trabalho experimental, que é a criação de um papel anti-bacteriano para desinfecção de água, fez-se a validação do trabalho experimental no Laboratório de Águas de Consumo, pertencente à SMAS de Almada sob a orientação do Mestre Paulo Nico.

Os testes efectuados consistiram em filtrações de água contaminada, pelo método de filtração de membrana.

Por forma a otimizar os resultados realizaram-se vários testes, contudo, irão só ser apresentados os mais significativos.

As primeiras membranas (papéis) a serem testadas foram as que continham acetato de zinco com concentrações de 10, 50 e 100 mM, pois foram os papéis que exibiram melhor actividade anti-bacteriana.

Nos dois primeiros testes realizados recorreu-se a amostras de água provenientes de uma ETAR, correspondendo a uma água de saída, encontrando-se muito turva, o que é indicativo de uma elevada densidade bacteriana. Após as filtrações, e dado que a água residual contém vários tipos de bactérias, foi feita a pesquisa dos microrganismos indicadores de contaminação: *E.coli* e *E.fecalis*.

No primeiro teste fizeram-se três filtrações, cada uma delas efectuada com a membrana contendo 10, 50 e 100 mM de acetato de zinco, e os resultados consistiram em placas com colónias incontáveis, os controlos positivos apresentaram valores na ordem dos $1,29 \times 10^8$ UFC's para *E.coli* e $1,22 \times 10^7$ UFC's para *E.faecalis* tendo sido feitas diluições de 10^{-5} , de modo a fazer a contagem. Na **Figura 4.39** apresentam-se as imagens dos controlos positivos para as duas bactérias (diluição 10^{-5}) assim como os resultados obtidos decorrentes da filtração com as membranas de 10, 50 e 100 mM para *E.coli* e *E.faecalis*, respectivamente.

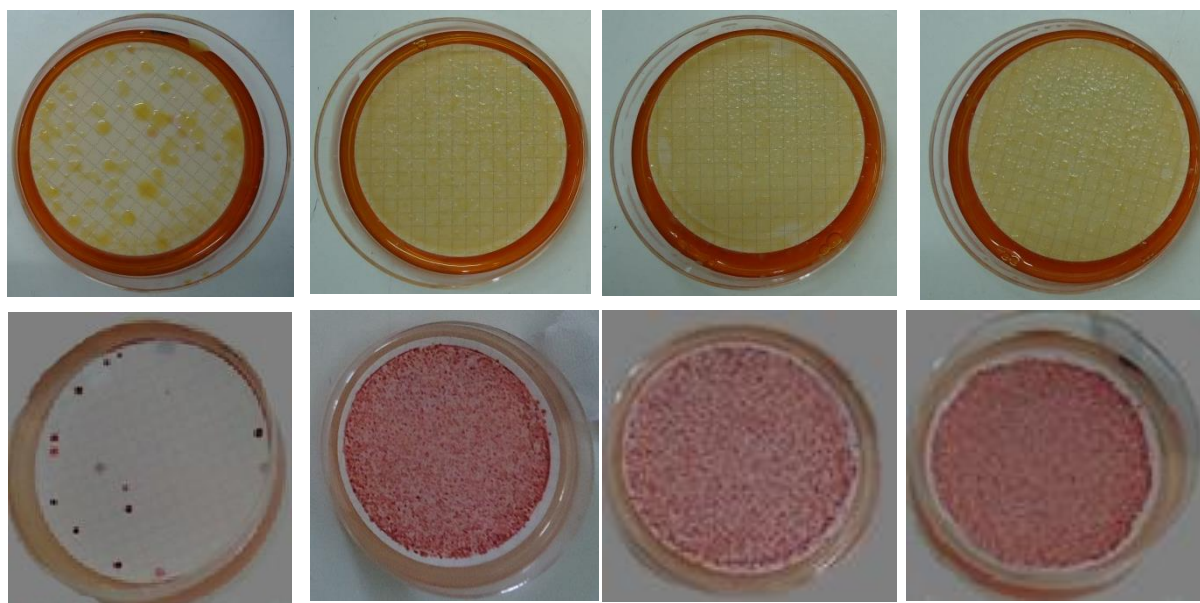


Figura 4.39. Em cima: controlo positivo e resultados decorrentes das filtrações com as membranas de 10, 50 e 100 mM de acetato de zinco para *E.coli*; e (em baixo).para *E. faecalis*

Pela **Figura 4.39**, constata-se a elevada quantidade de bactérias presentes, o que pode indicar que a actividade anti-bacteriana das membranas usadas não foi suficiente para inibir o crescimento anti-bacteriano. Face a estes resultados, tentou-se provar a actividade anti-bacteriana dos papéis sobrepondo três membranas para cada filtração, e assim, aumentar-se-ia o tempo de contacto, pois a água iria demorar mais tempo a passar pelas três membranas e também se iria aumentar “a carga” de nanopartículas. Porém, o resultado foi idêntico às filtrações anteriores dada a alta densidade bacteriana.

Posto isto, adoptou-se outra estratégia, que consistiu em simular amostras de água contaminada, de uma forma controlada, com recurso a lenticulas, pequenos frascos de plástico contendo bactérias liofilizadas, (**Figura 4.40**) colocando-as na peptona salina (**Figura 4.41**), uma “água” rica em nutrientes. Os resultados obtidos segundo esta metodologia estão nas **Tabelas 4.17, 4.18, 4.19, 4.20 e 4.21**.

Dado que a quantidade de UFC colocadas na peptona salina foi superior a todos os restantes testes efectuados, sendo portanto, uma concentração bacteriana considerável, para esta filtração realizaram-se os testes com as três membranas sobrepostas para cada concentração, 10, 50 e 100 mM de acetato de zinco.

Os resultados decorrentes das filtrações efectuadas estão representados na **Tabela 4.17**.

Por observação da tabela, verifica-se que ocorreu um efeito bactericida total com as membranas de 10 e 100 mM, efeito esse apenas para *E.coli*. Note-se, ainda, que, em relação á *E.coli*, a membrana contendo uma concentração de 50 mM teve um efeito bactericida de cerca de 90 % para um tempo de filtração de 26 segundos, um tempo muito inferior às membranas que demonstraram um efeito bactericida de 100%.

Porém, apesar do efeito bactericida ter sido demonstrado, atendendo à última coluna da tabela, onde estão os resultados decorrentes da análise aos filtrados, pela técnica de espectroscopia de absorção atômica, nomeadamente em termos de zinco, constata-se que a concentração de zinco presente na água é elevada, pois de acordo com os *Decretos de Lei nº 236/98 e 306/2007*, (“Dec-Lei_236_1998,” 1998)(Nacional, 2007) o valor máximo admissível (VMA) nas águas doces superficiais destinadas ao consumo humano é de 3 mg/L; Já em relação á água para consumo humano o VMA para [Zn] = 5,0 µg/L. Posto isto, verifica-se que a [Zn] obtida no filtrado se encontra acima dos limites estabelecidos.



Figura 4.39. Lenticulas

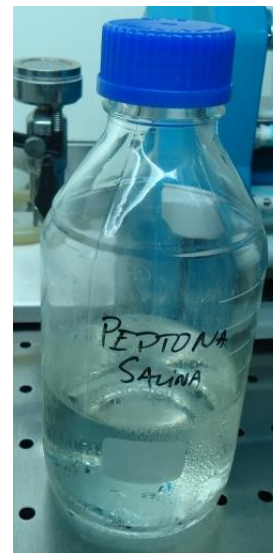


Figura 4.40. Peptona Salina

Tabela 4.17. Resultados decorrentes dos ensaios efectuados com as três membranas sobrepostas de Acetato de Zinco = 10, 50 e 100 mM.

descrição	bactéria	volume filtrado (mL)	tempo (s)	tempo contacto (s/mL)	velocidade retenção (mL/s)	contagem	resultado (UFC/100mL)	taxa redução (%)	[Zn] = (mg/L) no filtrado
controlo E. coli	E. coli	100				135	135		
controlo Enterococos	Enterococos	100				140	140		
3 membranas Acet. Zn 10 mM sobrepostas	E. coli	90	94	1,04	0,957	0	0	100%	12,1
	Enterococos	90	153	1,70	0,588	112	160	-14%	32,7
3 membranas Acet. Zn 50 mM sobrepostas	E. coli	90	26	0,29	3,462	10	14	89%	28,5
	Enterococos	90	297	3,30	0,303	36	51	63%	73
3 membranas Acet. Zn 100 mM sobrepostas	E. coli	90	292	3,24	0,308	0	0	100%	76,3
	Enterococos	90	49	0,54	1,837	31	44	68%	80,9

Uma vez que com as três membranas sobrepostas se obtiveram elevadas quantidades de zinco no filtrado, no teste seguinte usou-se apenas uma membrana para cada filtração, mais uma vez com as concentrações de 10, 50 e 100 mM, fazendo-se inclusivé ensaios para membranas com $[np'sAg] = 10$ mM, e também testes com controlos negativos (membranas virgens).

A quantidade de UFC colocadas na peptona salina foi inferior comparativamente com o teste anterior. Os resultados estão expressos na **Tabela 4.18**.

Face aos resultados obtidos, verifica-se que os efeitos bactericidas foram totais para as membranas com a concentração de 50 mM, para ambas as bactérias.

Por observação dos tempos de filtração para todas as membranas, verifica-se que os maiores tempos foram para estas membranas, levando portanto, a um maior tempo de contacto.

Contudo, os valores de [Zn] continuam a ser superiores aos permitidos por Lei.

Em relação às membranas que continham $[np'sAg] = 10$ mM, a membrana relativa à *E.coli* exibiu alguma actividade anti-bacteriana; Já para *E.faecalis* a taxa de redução negativa indica uma possível contaminação.

As [Ag] estão ilustradas na última coluna, com asteriscos, onde o asterisco vermelho indica uma quantidade de prata superior á permitida por lei, que está estabelecida como sendo 0,01 mg/L e para os *E. fecais*, como não foi detectada a prata assumiu-se que a [Ag] estaria abaixo do limite de detecção do aparelho, isto é, $<0,014$ mg/L.

Por fim, os ensaios com a membrana virgem (controlo negativo) não visavam “ver” a actividade anti-bacteriana, mas sim ver de que forma as possíveis diferenças a nível de porosidade, uma vez que como este papel é papel de filtro de café, atendendo ao fim a que se destina, não é sujeito a controlos de qualidade.

Com os resultados observados na **Tabela 4.19**, verificou-se, para ambas as bactérias uma taxa de redução de 19 e 12 % para *E.coli* e *E. faecalis*, respectivamente.

Tabela 4.18. Resultados decorrentes dos ensaios efectuados com as membranas virgens, de acetato de Zinco = 10, 50 e 100 mM e com a membrana com [np'sAg] = 10 mM.

descrição	bacteria	volume filtrado (mL)	tempo (s)	tempo contacto (s/mL)	velocidade retenção (mL/s)	contagem	resultado (UFC/100mL)	taxa redução (%)	[Zn] = (mg/L) no filtrado
controlo E. coli	E. coli	100				54	54		
controlo Enterococos	Enterococos	100				127	127		
membrana virgem	E. coli	70	28	0,40	2,500	22	44	19%	0,039
	Enterococos	70	17	0,24	4,118	56	112	12%	0,027
membrana np'sAg 10 mM	E. coli	70	19	0,27	3,684	22	44	19%	0,025*
	Enterococos	70	21	0,30	3,333	69	138	-9%	<0,014*
membrana acet zinco 10mM	E. coli	70	113	1,61	0,619	28	56	-4%	24,6
	Enterococos	70	31	0,44	2,258	72	144	-13%	45,4
membrana acet zinco 50mM	E. coli	70	143	2,04	0,490	0	0	100%	70,7
	Enterococos	70	231	3,30	0,303	0	0	100%	118
membrana acet zinco 100mM	E. coli	70	21	0,30	3,333	23	46	15%	32,8
	Enterococos	70	24	0,34	2,917	64	128	-1%	29,7

Assim, de maneira a verificar as variações para o papel virgem, fizeram-se mais ensaios concluindo-se que as taxas de redução podem ser significativas, pois dos testes realizados, chegou-se aos 37 % de redução bacteriana.

Em relação aos tempos de filtração estes mantiveram-se constantes, à excepção de um ensaio que demorou mais do dobro do tempo - verificado para as membranas anteriores a escoar.

Posto isto, conclui-se que estas variações inerentes ao papel podem afectar os resultados de forma significativa. Na **Tabela 4.19.** apresentam-se os resultados.

Tabela 4.19. Resultados decorrentes dos ensaios efectuados com as membranas virgens

descrição	bactéria	volume filtrado (mL)	tempo (s)	tempo contacto (s/mL)	velocidade retenção (mL/s)	contagem	resultado (UFC/100mL)	taxa redução (%)
Controlo	Enterococos	50				38	76	
	E. coli	50				24	48	
Membrana virgem	Enterococos	120	30	0,25	4,000	36	72	5
	E. coli					22	44	8
Membrana virgem	Enterococos	120	26	0,22	4,615	33	66	13
	E. coli					25	50	4
Membrana virgem	Enterococos	120	27	0,23	4,444	29	58	24
	E. coli					24	48	0
Membrane virgem	Enterococos	120	28	0,23	4,286	24	48	37
	E. coli					29	58	-21
Membrana virgem	Enterococos	120	69	0,58	1,739	30	60	21
	E. coli					27	54	-13

Por fim, realizaram-se testes com as membranas contendo prata e zinco, em que ambos os percursos (nitrato de prata para a síntese de npAg's acetato de zinco para a síntese de np'sZnO) tinham uma concentração de 10 mM.

No decorrer dos vários testes efectuados, observou-se que as membranas com as np'sAg testadas possuíam "deformações" nos limites destas, tal facto devido à síntese, que é realizada com altas temperaturas e o papel quando secava acabava por ficar enrugado, e tais deformações nem sempre permitiam um "encaixe" perfeito no dispositivo de filtração o que acabava por influenciar os resultados. Aliando este problema à passagem excessiva de metais (principalmente de zinco) para o filtrado, adoptou-se um novo método, que consistiu em passar as membranas com np'sAg e acetato de zinco a ferro, e colocou-se uma membrana virgem por cima da membrana com np'sAg e acetato de zinco e outra por baixo com o objectivo de se reterem as np's entre as membranas e com vista a passar o mínimo de metais para o filtrado. Na **Tabela 4.21**, efectuaram-se os mesmos ensaios com a diferença de que se passaram as três membranas (membrana virgem/ membrana com np'sAg e acetato de zinco /membrana virgem) a ferro, em simultâneo, de modo a que houvesse um maior isolamento entre as três membranas e os metais não passassem para a amostra filtrada, e a quantidade de UFC de *E.coli* colocadas na peptona salina foi significativamente inferior.

Observando os resultados na **Tabela 4.20**, verifica-se que para um dos ensaios houve uma taxa de redução de praticamente 90 % para *E.coli*. Note-se, que por comparação com a **Tabela 4.17.**, para a membrana de 10mM com acetato de zinco que a [Zn] é muito inferior, contudo não o suficiente para atender aos requisitos para a água de consumo. Já em relação às np's de prata, a quantidade detectada no filtrado também foi superior ao limite máximo permitido por Lei. Posto isto, constata-se que para a mesma concentração de percursos a lixiviação dos iões de zinco para o filtrado ocorre mais facilmente do que os iões da prata, deduzindo-se que tal facto terá que ver com as sínteses em si; Em particular, como a mistura reaccional [acetato de zinco/acetona] = 10 mM não originou as np's de ZnO após o seu aquecimento, a 90 ° C – tal só aconteceu para os papéis autoclavados, o que permanece nestas membranas são cristais de acetato de zinco e este reagente como é muito solúvel em água, vai-se dissolver na água a ser filtrada, durante a passagem desta, o que leva a grandes valores de [Zn] no filtrado.

Tabela 4.20. Resultados decorrentes dos ensaios efectuados com os filtros [Ag/Zn] = 10 mM

descrição	bactéria	volume filtrado (mL)	tempo (s)	tempo contacto (s/mL)	velocidade retenção (mL/s)	contagem	resultado (UFC/100mL)	taxa redução (%)	[Zn] = (mg/L) no filtrado	[Ag] = mg/L no filtrado
Controlo	Enterococos	100				64	64			
	E. coli	100				68	68			
membrana np'sAg e Acet zinco 10 mM	Enterococos	250	605	2,42	0,413	44	44	42	8,04	0,019
	E. coli					57	57	-19	8,04	0,019
membrana np'sAg e Acet zinco 10 mM	Enterococos	250	491	1,96	0,509	33	33	57	9,04	0,05
	E. coli					46	46	4	9,04	0,05
membrana np'sAg e Acet zinco 10 mM	Enterococos	250	617	2,47	0,405	8	8	89	7,58	0,063
	E. coli					56	56	-17	7,58	0,063

Na **Tabela 4.21.** encontram-se os resultados para as mesmas membranas, mas desta vez passadas a ferro em simultâneo, que demonstram a eficácia bactericida das membranas já que a taxa de redução foi de 100 % para ambas as estirpes bacterianas.

Uma vez que a constituição destas membranas é a mesma que as membranas anteriores, e o tempo de filtração, de contacto e velocidade de retenção são idênticos, deduz-se que a diferença das taxas de redução destas membranas para as membranas anteriores se deve ao uso das três membranas passadas em simultâneo, o que poderá ter providenciado uma maior junção das fibras do papel retendo assim mais facilmente as bactérias à medida que iam passando e possivelmente devido à presença de menores UFC de *E.coli*.

Com este procedimento, e também por comparação com os resultados da tabela anterior, conseguiu-se diminuir para cerca de metade a [Zn] no filtrado, porém a [Ag] aumentou. Os resultados destes ensaios ilustram-se nas **Figuras 4.42.** e **4.43.**

Tabela 4.21. Resultados decorrentes dos ensaios efectuados com os filtros [Ag/Zn] = 10 mM

descrição	bactéria	volume filtrado (mL)	tempo (s)	tempo contacto (s/mL)	velocidade retenção (mL/s)	contagem	resultado (UFC/100mL)	taxa redução (%)	[Zn] = (mg/L) no filtrado	[Ag] = mg/L no filtrado
Controlo	Enterococos	100				85	85			
	E. coli	100				45	45			
membrana np'sAg e Acet zinco 10 mM	Enterococos	250	605	2,42	0,413	6	6	92	4,75	0,5338
	E. coli					0	0	100	4,75	0,5338
membrana np'sAg e Acet zinco 10 mM	Enterococos	250	586	2,34	0,427	0	0	100	8,4	0,375
	E. coli					0	0	100	8,4	0,375
membrana np'sAg e Acet zinco 10 mM	Enterococos	250	488	1,95	0,512	0	0	100	3,36	0,45
	E. coli					0	0	100	3,36	0,45

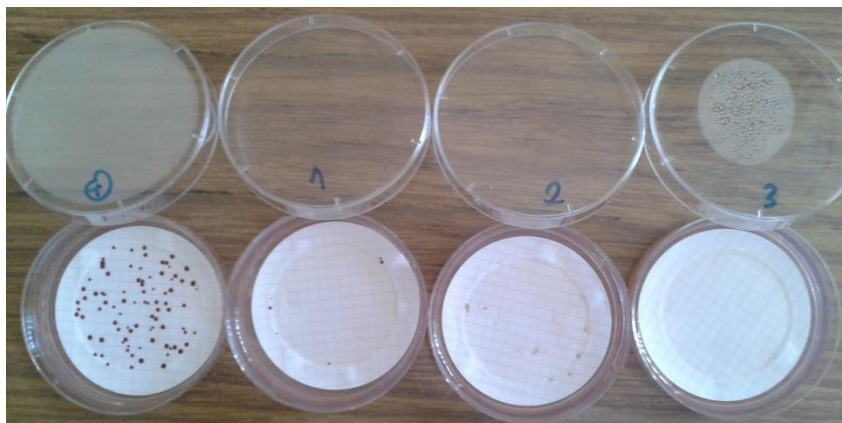


Figura 4.42. Ilustração dos resultados mencionados na **Tabela 4.21**, para *E. faecalis*

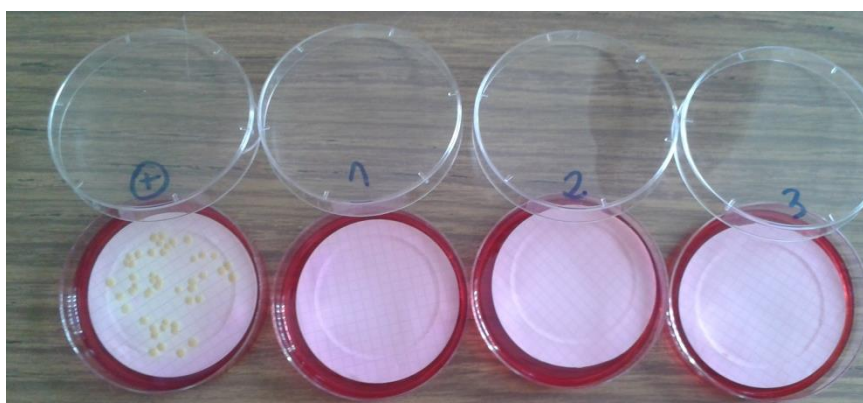


Figura 4.43. Ilustração dos resultados mencionados na **Tabela 4.21**, para *E. coli*.

5. Conclusões

Atendendo ao contexto actual em África, onde milhares de pessoas morrem todos os anos por contaminação das fontes de água alternativas contendo microrganismos patogénicos, torna-se necessário e urgente o desenvolvimento de sistemas de tratamento de água portáteis, de baixo custo e efectivos.

E foi nesta linha que se inseriu o trabalho experimental, o desenvolvimento de um papel de bactericida para desinfecção de água e de baixo custo.

Assim, aliando a matriz fibrosa de um material leve, de baixo custo, e também fácil de manipular e portanto fácil de se aliar às propriedades anti-bacterianas das nanopartículas, que, com o crescimento da nanotecnologia já surgem como uma alternativa viável em substituir certos agentes anti-bacterianos convencionais, conseguiu-se criar um papel bactericida, cumprindo-se com o objectivo proposto.

A actividade experimental incidiu na síntese de nanopartículas de prata, óxido de zinco e ambas, em que se realizaram estudos específicos para cada tipo de nanopartículas, variando parâmetros como a metodologia de síntese, tipo de redutor usado (no caso das np's de prata), concentração, e activação por luz ultravioleta.

No caso das np's de prata variou-se o tipo de síntese, tipo de redutor e concentração, concluindo-se que em termos de np'sAg o papel que exibiu melhor actividade anti-bacteriana foi o papel resultante da síntese "*via impregnação*" via citrato de sódio, para a maior concentração. Através das técnicas de caracterização estrutural e térmica observou-se que os picos para a prata se encontravam bem definidos, assim como na análise termogravimétrica, que comparando o método "*in situ*" com o método da impregnação, a percentagem de massa residual que ficou no papel via síntese "*in situ*" foi maior quando comparada com a outra técnica de incorporação de np's no papel, indicando a metodologia "*in situ*" como a melhor técnica de incorporação.

Em relação à síntese das np's de ZnO, a metodologia, à semelhança das np'sAg, também foi "*in situ*". Para além de se variar a concentração de precursor (acetato de zinco di-hidratado) de 1 a 100 mM, dada a fotossensibilidade do ZnO, achou-se interessante irradiar o papel com ZnO com a luz ultravioleta com a expectativa de poder existir algum sinergismo, e com isto, também se mantinha o papel estéril, o que é extremamente importante em termos de testes anti-bacterianos.

Deste modo, inseriu-se uma outra variável, a autoclave.

Contudo, após submeter os papéis às diferentes esterelizações, e com a análise de raios-X, constatou-se que as amostras autoclavadas formaram ZnO, ao passo de que os papéis sem esterilização e activados por luz ultravioleta apresentaram picos de acetato de zinco.

Com a realização dos testes anti-bacterianos concluiu-se que nas amostras autoclavadas a actividade diminua comparativamente com os papéis sem esterilização e activados por radiação UV; Para estes últimos foi para os quais se obteve maiores halos de inibição nos testes anti-bacterianos, em particular para as concentrações de acetato de zinco de 10, 50 e 100 mM.

Com isto verificou-se que a actividade anti-bacteriana para um sal de zinco era maior do que as próprias np's de ZnO. Isto sugere que a síntese de np's de ZnO pode-se tornar "inútil" em termos de efeitos anti-bacterianos quando comparada com a actividade anti-bacteriana de um sal de zinco, reforçando a ideia de que a actividade anti-bacteriana se deve à libertação de íons de zinco.

Em relação aos papéis que continham ambos os metais, prata e zinco, por analogia aos papéis com acetato de zinco, submeteu-se o papel à radiação UV, e à autoclave, verificando-se mais uma vez que só se obiveram as np's de ZnO para os papéis autoclavados.

A Morfologia destas np's apresentou-se maioritariamente esférica, sugerindo a maior percentagem em np's de prata, também confirmado pela técnica de Espectroscopia Dispersiva de raios-X.

Em relação aos testes anti-bacterianos, estes foram efectuados para mais duas outras estirpes *E.coli* NCTC9001 e *E.faecalis* NCTC775, em que o efeito anti-bacteriano foi ligeiramente mais baixo por comparação com as outras bactérias.

Contudo, dado que o efeito anti-bacteriano foi significativo, estes papéis foram seleccionados para os testes de filtração de membrana em água contaminada.

Por fim, a validação do trabalho experimental foi feita por filtrações de membrana em água contaminada, em que se fazia passar a mesma pelos papéis que exibiram melhor carácter anti-bacteriano, cujo filtrado se iria fazer passar pelas membranas nanométricas de modo a determinar o nº de UFC final.

Em particular, com as membranas contendo prata e zinco, obtiveram-se taxas de redução de aproximadamente 100 % para *E.coli* e *E.faecalis*, para uma amostra de "água contaminada com 130 UFC" por 100 mL.

De salientar que o simples facto de passar os três filtros em simultâneo conferiu uma enorme redução anti-bacteriana, e também significativa redução dos metais no filtrado.

Este foi analisado pela técnica de espectroscopia de absorção atómica de chama, verificando-se que os valores obtidos para a concentração de zinco e prata se encontravam acima do permitido por lei para as águas de consumo, cujos valores de [Zn] foram de 3,26 mg/L (o valor máximo para águas de consumo é de 3 mg/L) e o valor da [Ag] foi de 0,45 mg/L, face aos 0,01 mg/L permitidos.

De notar que apesar das concentrações de Prata e Zinco não estarem dentro dos limites para a água de consumo mencionados nos *Decretos de Lei* devidos, a aplicação dos filtros seria em Países carenciados, já que os mesmos ficam a um preço muito acessível (0,10 cêntimos com cristais de zinco e 0,32 cêntimos contendo cristais de zinco e np^{os} de Prata), e portanto, uma maior quantidade dos metais na água seria um “mal menor” face à realidade actual nos mesmos.

6. Perspectivas Futuras

No seguimento deste estudo sugere-se a pesquisa de métodos de síntese de np's mais eficazes, assim como também algum estudo em sais de zinco, nomeadamente como agentes anti-bacterianos. Por forma a evitar a excessiva libertação de iões de zinco por parte destes poderá investir-se num revestimento da matriz fibrosa através de um material polimérico, de modo a controlar essa libertação. Em termos de matéria-prima, poderá experimentar-se funcionalizar as np's de óxido de zinco ou até mesmo partículas de acetato de zinco em papel vegetal ou até mesmo em tecidos.

Bibliografia

Acar, F.J; Goldstein ,W. F “Antibiotics in Laboratory Medicine” Cap.1: Disk Susceptibility Test (1996) 4.^a Edição

“10 • Antibacterial agents. (n.d.).

Almeida, A. (2007). António José Madeira Nogueira Qualidade microbiológica e química das águas de consumo humano do Distrito de Bragança.

Alonso, A., Muñoz-Berbel, X., Vigués, N., Rodríguez-Rodríguez, R., Macanás, J., Muñoz, M., ... Muraviev, D. N. (2013). Superparamagnetic Ag@Co-Nanocomposites on Granulated Cation Exchange Polymeric Matrices with Enhanced Antibacterial Activity for the Environmentally Safe Purification of Water. *Advanced Functional Materials*, 23(19), 2450–2458. doi:10.1002/adfm.201202663

Azam, A. (2012). Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria : a comparative study, 6003–6009.

Bammidi, S. R. (2011). SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF ZINC OXIDE NANOPARTICLES AND ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST BACILLUS SUBTILIS AND ESCHERICHIA COLI Haritha Meruvu , Meena Vangalapati * , Seema Chaitanya Chippada, 4(1), 217–222.

Baruah, S., Pal, S. K., & Dutta, J. (2012). Nanostructured Zinc Oxide for Water Treatment, 90–102.

Bioidênticos, H., & Estradiol, E. E. (2013). CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA (TG / DTG , DTA , DSC , DSC- fotovisual) DE CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA (TG / DTG , DTA , DSC , DSC- fotovisual) DE HORMÔNIOS BIOIDÊNTICOS (ESTRADIOL E ESTRADIOL).

CHAPTER 3. DEVICE FABRICATION AND CHARACTERIZATION TECHNIQUES. (n.d.).

Ci, F. D. E. (2009). JORGE MAIÃO PERES TEIXEIRA DIAS NOBLE METAL NANOPARTICLES – Au AND Ag – FOR BIODETECTION.

Cioffi, N., & Mahendra, R. (2012). Nano-Antimicrobials Progress and Prospects. Retrieved from [http://books.google.pt/books?id=RmMISXouKnYC&lpg=PA167&dq=zinc ions bacteriostatic effect&hl=pt-PT&pg=PA167&output=embed](http://books.google.pt/books?id=RmMISXouKnYC&lpg=PA167&dq=zinc+ions+bacteriostatic+effect&hl=pt-PT&pg=PA167&output=embed)

Coliform Bacteria and Drinking Water. (2011).

Control, Q. (n.d.). 5.14.1 McFarland Standards, 1–4.

Costa, M. (2012). Mafalda Quintino do Nascimento Costa.

Cunha_2013 vs. (n.d.).

Dankovich, T. a, & Gray, D. G. (2011). Bactericidal paper impregnated with silver nanoparticles for point-of-use water treatment. *Environmental science & technology*, 45(5), 1992–8. doi:10.1021/es103302t

De, T. (n.d.). Sumário 1 –, (48), 1–14.

Dec-Lei_236_1998. (1998), 3676–3722.

Dhakras, P. a. (2011). Nanotechnology applications in water purification and waste water treatment: A review. *International Conference on Nanoscience, Engineering and Technology (ICONSET 2011)*, 285–291. doi:10.1109/ICONSET.2011.6167965

Doutorado, T. De. (2012). Ufop – cetec – uemg.

Drinking Water and Sanitation Progress on. (2014).

Drinking-water, F. F. O. R. S. (n.d.-a). Microbial fact sheets, (Chapter 1), 231–306.

Drinking-water, F. F. O. R. S. (n.d.-b). Microbial aspects, (Chapter 1), 117–153.

Duarte, P. B., & Horizonte, B. (2011). Microrganismos indicadores de poluição fecal em recursos hídricos.

Gangadharan, D., Harshvardan, K., Gnanasekar, G., Dixit, D., Popat, K. M., & Anand, P. S. (2010). Polymeric microspheres containing silver nanoparticles as a bactericidal agent for water disinfection. *Water research*, 44(18), 5481–7. doi:10.1016/j.watres.2010.06.057

Ghule, K., Ghule, A. V., Chen, B.-J., & Ling, Y.-C. (2006). Preparation and characterization of ZnO nanoparticles coated paper and its antibacterial activity study. *Green Chemistry*, 8(12), 1034. doi:10.1039/b605623g

Global Salm-Surv. (2003).

Guzmán, M. G., Dille, J., & Godet, S. (2009). Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity, 104–111.

Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., Jimenez de Aberasturi, D., de Larramendi, I. R., Rojo, T., ... Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in biotechnology*, 30(10), 499–511. doi:10.1016/j.tibtech.2012.06.004

Holister, P. (n.d.). Nanoparticles, (3).

- Hu, X. L., Masuda, Y., Ohji, T., & Kato, K. (2010). Rapid Low-Temperature Synthesis of Porous ZnO Nanoparticle Film by Self-Hydrolysis Technique. *Key Engineering Materials*, 445, 123–126. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.445.123
- Iguchi, Y., Ichiura, H., Kitaoka, T., & Tanaka, H. (2003). Preparation and characteristics of high performance paper containing titanium dioxide photocatalyst supported on inorganic fiber matrix. *Chemosphere*, 53(10), 1193–9. doi:10.1016/S0045-6535(03)00582-4
- Jagtap, U. B., & Bapat, V. a. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* Lam. seed extract and its antibacterial activity. *Industrial Crops and Products*, 46, 132–137. doi:10.1016/j.indcrop.2013.01.019
- Jain, P., & Pradeep, T. (2005). Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnology and bioengineering*, 90(1), 59–63. doi:10.1002/bit.20368
- joe-1-1-5.pdf. (n.d.).
- Jones, N., Ray, B., Ranjit, K. T., & Manna, A. C. (2007). Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.01012.x
- Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(11), 1749–55. doi:10.1086/647952
- Judith, P., & Espitia, P. (2012). Zinc Oxide Nanoparticles : Synthesis , Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications, 1447–1464. doi:10.1007/s11947-012-0797-6
- Kallman, E. N., Oyanedel-craver, V. A., Asce, A. M., Smith, J. A., & Asce, M. (2011). Ceramic Filters Impregnated with Silver Nanoparticles for Point-of-Use Water Treatment in Rural Guatemala, (June), 407–416. doi:10.1061/(ASCE)EE.1943-7870
- Khamkure, S., Cervantes, E. P., Melo, P. G., & González, A. Z. (2013). ENHANCED REMOVAL OF FECAL BACTERIA BY ZINC-MODIFIED ZEOLITE IN AN INTERMITTENT MEDIA INFILTRATION SYSTEM, 12(11), 2149–2156.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., ... Cho, M.-H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 3(1), 95–101. doi:10.1016/j.nano.2006.12.001
- Koga, H., Kitaoka, T., & Wariishi, H. (2009). In situ synthesis of silver nanoparticles on zinc oxide whiskers incorporated in a paper matrix for antibacterial applications. *Journal of Materials Chemistry*, 19(15), 2135. doi:10.1039/b820310e

Kołodziejczak-radzimska, A., & Jesionowski, T. (2014). Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review, 2833–2881. doi:10.3390/ma7042833

LABORATORY METHODOLOGIES FOR BACTERIAL ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. (2012), 1–11.

Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D. Y., Brunet, L., Liga, M. V, Li, D., & Alvarez, P. J. J. (2008). Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water research*, 42(18), 4591–602. doi:10.1016/j.watres.2008.08.015

Lin, S., Huang, R., Cheng, Y., Liu, J., Lau, B. L. T., & Wiesner, M. R. (2013). Silver nanoparticle-alginate composite beads for point-of-use drinking water disinfection. *Water research*, 47(12), 3959–65. doi:10.1016/j.watres.2012.09.005

Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR). (2011), (c), 2011.

Loo, S.-L., Fane, A. G., Krantz, W. B., & Lim, T.-T. (2012). Emergency water supply: a review of potential technologies and selection criteria. *Water research*, 46(10), 3125–51. doi:10.1016/j.watres.2012.03.030

Loo, S.-L., Fane, A. G., Lim, T.-T., Krantz, W. B., Liang, Y.-N., Liu, X., & Hu, X. (2013). Superabsorbent cryogels decorated with silver nanoparticles as a novel water technology for point-of-use disinfection. *Environmental science & technology*, 47(16), 9363–71. doi:10.1021/es401219s

Lv, Y., Liu, H., Wang, Z., Liu, S., Hao, L., Sang, Y., ... Boughton, R. I. (2009, April). Silver nanoparticle-decorated porous ceramic composite for water treatment. *Journal of Membrane Science*. doi:10.1016/j.memsci.2009.01.007

Manna, J., Begum, G., Kumar, K. P., Misra, S., & Rana, R. K. (2013). Enabling antibacterial coating via bioinspired mineralization of nanostructured ZnO on fabrics under mild conditions. *ACS applied materials & interfaces*, 5(10), 4457–63. doi:10.1021/am400933n

Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. V. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1531–1551. doi:10.1007/s11051-010-9900-y

Margarida, J., & Gomes, C. (2011). Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente.

Mayekar, J., Dhar, V., & Radha, S. (2014). ROLE OF SALT PRECURSOR IN THE SYNTHESIS OF ZINC OXIDE NANOPARTICLES, 2319–2321.

Meays, C. L., Broersma, K., Nordin, R., & Mazumder, A. (2004). Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. *Journal of environmental management*, 73(1), 71–9. doi:10.1016/j.jenvman.2004.06.001

- Mijnendonckx, K., Leys, N., Mahillon, J., Silver, S., & Van Houdt, R. (2013). Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 26(4), 609–21. doi:10.1007/s10534-013-9645-z
- Mohmood, I., Lopes, C. B., Lopes, I., Ahmad, I., Duarte, A. C., & Pereira, E. (2013). Nanoscale materials and their use in water contaminants removal-a review. *Environmental science and pollution research international*, 20(3), 1239–60. doi:10.1007/s11356-012-1415-x
- Motshekga, S. C., Ray, S. S., Onyango, M. S., & Momba, M. N. B. (2013). Microwave-assisted synthesis, characterization and antibacterial activity of Ag/ZnO nanoparticles supported bentonite clay. *Journal of hazardous materials*, 262, 439–46. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.08.074
- Nacional, C. (2007). MINISTÉRIO DO AMBIENTE , DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO E DO DESENVOLVIMENTO REGIONAL.
- Ngwenya, N., Ncube, E. J., & Parsons, J. (2013). Recent advances in drinking water disinfection: successes and challenges. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 222, 111–70. doi:10.1007/978-1-4614-4717-7_4
- Odonkor, S. T., & Ampofo, J. K. (2013). Escherichia coli as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiology Research*, 4(1), 5–11. doi:10.4081/mr.2013.e2
- Oyanedel-Craver, V. a, & Smith, J. a. (2008). Sustainable colloidal-silver-impregnated ceramic filter for point-of-use water treatment. *Environmental science & technology*, 42(3), 927–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18323124>
- Parte, I. (2013). Indicadores Microbiológicos da Qualidade Microbiológica da água, (11), 8–9.
- Pasquet, J., Chevalier, Y., Couval, E., Bouvier, D., Noizet, G., Morlière, C., & Bolzinger, M.-A. (2014). Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five micro-organisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties. *International journal of pharmaceutics*, 460(1-2), 92–100. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.10.031
- Pati, R., Mehta, R. K., Mohanty, S., Padhi, A., Sengupta, M., Vaseeharan, B., ... Sonawane, A. (2014). Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 1–14. doi:10.1016/j.nano.2014.02.012

- Peter-Varbanets, M., Zurbrügg, C., Swartz, C., & Pronk, W. (2009). Decentralized systems for potable water and the potential of membrane technology. *Water research*, 43(2), 245–65. doi:10.1016/j.watres.2008.10.030
- Pillai, Z. S., & Kamat, P. V. (2004). What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method ?, 945–951.
- Premanathan, M., Karthikeyan, K., Jeyasubramanian, K., & Manivannan, G. (2011). Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 7(2), 184–92. doi:10.1016/j.nano.2010.10.001
- Qu, X., Brame, J., Li, Q., & Alvarez, P. J. J. (2013). Nanotechnology for a safe and sustainable water supply: enabling integrated water treatment and reuse. *Accounts of chemical research*, 46(3), 834–43. doi:10.1021/ar300029v
- Qualidade da Água e Saúde Pública. (n.d.).
- Raghupathi, K. R., Koodali, R. T., & Manna, A. C. (2011). Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 27(7), 4020–8. doi:10.1021/la104825u
- Samplinganalysis, W. (n.d.). Water sampling and analysis, 51–72.
- Sciences, B. (2010). Potential applications of Nanoparticles Potential applications of Nanoparticles, 1(1).
- Singh, G., Joyce, E. M., Beddow, J., & Mason, T. J. (2012). EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ZnO NANOPARTICLES, 2(1), 106–120.
- Soares, S. (2013). Impregnação de fibras de celulose com nanopartículas de prata , óxido de zinco e óxido de cobre para aplicações anti- bacterianas.
- Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V, Rutkowsky, S. A., & Boritz, C. (2007). Synthesis and Study of Silver Nanoparticles, 84(2), 322–325.
- Sun, T., Hao, H., Hao, W.-T., Yi, S.-M., Li, X.-P., & Li, J.-R. (2014). Preparation and antibacterial properties of titanium-doped ZnO from different zinc salts. *Nanoscale research letters*, 9(1), 98. doi:10.1186/1556-276X-9-98
- Sutton, S. (2011). Measurement of Microbial Cells by Optical Density TERM IN AT ION IO N OF INOCULUM I NO CU FOR, 46–49.
- Talam, S., Karumuri, S. R., & Gunnam, N. (2012). Synthesis , Characterization , and Spectroscopic Properties of ZnO Nanoparticles, 2012. doi:10.5402/2012/372505

- Tang, C. (2013). Study of Photocatalytic Degradation of Methyl Orange on Different Morphologies of ZnO Catalysts, 2013(April), 19–24.
- Tankhiwale, R., & Bajpai, S. K. (2009). Graft copolymerization onto cellulose-based filter paper and its further development as silver nanoparticles loaded antibacterial food-packaging material. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 69(2), 164–8. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.11.004
- Technique, M. F., & Benefits, C. (1978). Step-by-step Procedures.
- Tiwari, D. K., Behari, J., & Sen, P. (2008). Application of Nanoparticles in Waste Water Treatment, 3(3), 417–433.
- Uddin, M. J., Cesano, F., Scarano, D., Bonino, F., Agostini, G., Spoto, G., ... Zecchina, a. (2008). Cotton textile fibres coated by Au/TiO₂ films: Synthesis, characterization and self cleaning properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 199(1), 64–72. doi:10.1016/j.jphotochem.2008.05.004
- Uskokovi, D. (2013). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Influence of size scale and morphology on antibacterial properties of ZnO powders hydrothermally synthesized using different surface stabilizing agents, 102, 21–28. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.07.033
- Vaseem, M., Umar, A., & Hahn, Y. (1988). *ZnO Nanoparticles : Growth , Properties , and Applications* (Vol. 5, pp. 1–36).
- Wang, M.-H., Zhou, F., Zhang, B., & Yao, C. (2013). Synthesis and characterization of low-dimensional ZnO nanocrystals in an aqueous solution. *Journal of Alloys and Compounds*, 581(3), 308–312. doi:10.1016/j.jallcom.2013.06.184
- Yamamoto, O. (2001). Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide, 3(April 2000), 643–646.
- Zhang, J., Zhang, M., & Zhang, K. (2014). Fabrication of poly (ether sulfone)/ poly (zinc acrylate) ultra fi ltration membrane with anti-biofouling properties. *Journal of Membrane Science*, 460, 18–24. doi:10.1016/j.memsci.2014.02.030
- Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Povey, M., & York, D. (2007). Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids), 479–489. doi:10.1007/s11051-006-9150-1
- Zhao, W., Ali, M. M., Aguirre, S. D., Brook, M. A., & Li, Y. (2008). Paper-Based Bioassays Using Gold Nanoparticle Colorimetric Probes, 80(22), 8431–8437. doi:10.1002/cbic.200-800282.Analytical